

INAUGURAL-Dissertation

Zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Humanbiologin Stefanie Schinkel

aus Dessau

Tag der mündlichen Prüfung:

Ansätze zur kausalen Gentherapie einer hereditären Kardiomyopathie im
Tiermodell durch gezielten Gentransfer mit
Adeno - assoziierten viralen Vektoren

Gutachter:

PD Dr. Jürgen Kleinschmidt

Prof. Dr. Gabriele Petersen

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Jürgen Kleinschmidt und PD Dr. Oliver J. Müller für die Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten sowie für die vielen hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen. Darüber hinaus danke ich PD Dr. Oliver J. Müller für die inspirative Begeisterung zur angewandten vorklinischen Forschung, die Möglichkeit an vielen interessanten Kongressen teilnehmen zu können und die kontinuierliche Betreuung meiner Arbeit, trotz eines eingespannten klinischen Alltags.

Prof. Dr. Gabriele Petersen danke ich für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens und ihre engagierte Mithilfe bei dieser Arbeit.

PD Dr. Raffi Bekerredjian danke ich für die Durchführung der für diese Arbeit essentiellen Ultraschalluntersuchungen.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern der AG Müller bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. Desireé Rutschow, Dr. Raphael Zeller, Dr. Andreas Jungmann, Antje Weber und Martin Vogel für die vielen praktischen Tips, das offene Ohr und die Unterstützung.

Ganz besonderes danken möchte ich Dr. Ben Marquez-Klaka ohne dessen Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Mutter Gabriele Schinkel für die kontinuierliche finanzielle Unterstützung bedanken und dafür, dass sie immer an mich geglaubt hat. Oliver Lucas danke ich für sein interdisziplinäres Interesse an der Wissenschaft. Familie Karn danke ich für die fortwährende moralische Unterstützung. Meinen Schwiegereltern Juan und Maria Marquez-Klaka danke ich dafür, dass sie mich in allen Lebenslagen unterstützt haben. Bei meinen Großeltern Alois und Ursula Tandler möchte ich mich bedanken, dass sie für mich immer eine Inspiration waren, auch wenn sie das Ende dieser Doktorarbeit nicht mehr erleben durften.

INHALT

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	II
Originalarbeiten	III
1. Einleitung	1
1.1. Duchenne Muskeldystrophie	1
1.1.1. Struktur und Funktion des Dystrophins.....	1
1.1.2. Klinischer Verlauf der Duchenne Muskeldystrophie	2
1.1.3. Genetische Grundlagen der Duchenne Muskeldystrophie	3
1.1.4. Histopathologische Veränderungen.....	4
1.1.5. Therapie der Duchenne Muskeldystrophie	5
1.2. Die dilatative Kardiomyopathie.....	8
1.2.1. Definition und Klassifikation von Kardiomyopathien	8
1.2.2. Die dilatative Kardiomyopathie bei Duchenne Muskeldystrophie	9
1.2.3. Tiermodelle genetisch bedingter dilatativer Kardiomyopathien	11
1.2.4. Duchenne Muskeldystrophie Maus.....	13
1.3. Ansätze und Applikationen in der kardialen Gentherapie	15
1.3.1. Vektoren zum kardialen Gentransfer.....	15
1.3.2. Applikationsverfahren im kardiovaskulären Gentransfer	16
1.3.2.1. Ultraschall vermittelter Gentransfer.....	18
1.4. Adeno-assoziierten Viren (AAV) als Gentherapievektoren.....	19
1.4.1. Adeno-assoziierte Viren	19
1.4.2. Adeno-assoziierte Viren in der Gentherapie	20
1.4.2.1. Transduktionelle Regulation Adeno-assoziiierter viraler Vektoren.....	21
1.4.2.2. Regulation der Transgenexpression im Herzmuskel.....	22
1.5. Zielstellung der Arbeit	23
2. Material und Methoden.....	24
2.1. Material	24
2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	24
2.1.1.1. Allgemeine Chemikalien	24
2.1.1.2. Spezielle Chemikalien.....	25
2.1.1.3. Komplettsysteme	26
2.1.1.4. spezielle Materialien	26
2.1.2. Standardlösungen	27

2.1.2.1. Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	27
2.1.2.2. Nährmedien und Lösungen für Bakterienkulturen	27
2.1.2.3. Nährmedien und Lösungen für Zellkulturen	28
2.1.2.4. Virusproduktion	28
2.1.2.5. Proteinbiochemie	29
2.1.2.6. Histologische Reagenzien.....	30
2.1.3. Nukleinsäuren	31
2.1.3.1. Plasmide	31
2.1.3.2. Oligonukleotide	32
2.1.3.3. DNA – Längenstandards.....	34
2.1.3.4. Geräte	34
2.1.4. Organismen und Tiere	36
2.1.4.1. Bakterienstämme	36
2.1.4.2. eukaryotische Zellen	36
2.1.4.3. <i>Mus musculus</i>	36
2.1.4.4. <i>Rattus Norvegicus</i>	37
2.2. Methoden	37
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	37
2.2.1.1. Herstellung und Transformation chemisch Bakterien.....	37
2.2.1.2. Plasmidpräparation aus Bakterien	38
2.2.1.3. Isolation viraler und genomischer DNA aus Gewebe	38
2.2.1.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
2.2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	39
2.2.1.6. Extraktion von DNA – Fragmenten aus Agarosegelen.....	39
2.2.1.7. Ligation doppelsträngiger DNA – Fragmente	39
2.2.1.8. Polymerase – Kettenreaktion (PCR)	40
2.2.1.9. Standard – PCR zur Genotypisierung	40
2.2.1.10. Herstellung des dsAAV-CMV _{enh} -MLC0.26kb-EGFP	41
2.2.1.11. Subklonierung der Mikrodystrophin cDNA	42
2.2.1.12. Zielgerichtete Mutagenese.....	44
2.2.2. Zellbiologische Methoden.....	45
2.2.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	45
2.2.2.2. Standard – Transfektion eukaryotischer Zellen	45
2.2.3. Produktion und Aufreinigung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren (AAV).....	46
2.2.3.1. Transfektion eukaryotischer Zellen zur AAV-Produktion	46
2.2.3.2. Aufreinigung rekombinanter AAV	47
2.2.3.3. Quantifizierung rekombinanter AAV	48
2.2.3.4. Beladung von Mikrosphären mit rekombinanten AAV	48
2.2.4. Biochemische Methoden	49
2.2.4.1. Proteinaufreinigung aus Zellen	49
2.2.4.2. Proteinaufreinigung aus Geweben.....	49
2.2.4.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	49
2.2.4.4. Luziferase – Aktivitätsbestimmung in lysierten Gewebeproben	49
2.2.4.5. SDS-Polyacrylamid – Gelelektrophorese	50
2.2.4.6. Western – Blot	50
2.2.5. Tiermodell <i>Mus musculus</i>	51
2.2.5.1. Haltung und Behandlung von <i>Mus musculus</i>	51

2.2.5.2. Euthanasierung und Organentnahme	51
2.2.5.3. Troponin T – und Kreatinkinasebestimmung in Blutproben	51
2.2.5.4. Extrakardiale Messungen: Fraction of shortening	52
2.2.6. Tiermodell <i>Rattus norvegicus</i>	52
2.2.6.1. Haltung und Behandlung von <i>Rattus norvegicus</i>	52
2.2.7. Histologische Methoden	53
2.2.7.1. Kryokonservierung von Geweben	53
2.2.7.2. Kryoprotektive Konservierung von Geweben	53
2.2.7.3. Dünnschnittpräparation von kryokonserviertem Gewebe.....	53
2.2.7.4. Fluoreszenzbasierte Immunodetektion auf Kryoschnitten.....	54
2.2.7.5. Chemische Immunodetektion auf Kryoschnitten	54
2.2.7.6. Hämatoxylin Eosin Färbung	55
2.2.7.7. Van Gieson Färbung	55
2.2.8. <i>in silico</i> Arbeiten	56
3. Ergebnisse	57
3.1. Genotypisierung der Dystrophin defizienten Mauslinie DMD^{mdx}	57
3.1.1. Bestimmung des genetischen Hintergrundes der Mdx – Maus	58
3.2. Phänotypisierung der Mdx – Mauslinie	58
3.2.1. Histopathologische Untersuchungen des Herz- und Skelettmuskel	58
3.2.2. Erhebung des Immunstatus im Herz- und Skelettmuskel	62
3.2.3. Bestimmung relevanter Blutparameter	65
3.2.4. Kardiale Funktionsparameter	66
3.3. Systemischer Gentransfer in das Mausherz.....	67
3.3.1. Potential der transkriptionellen Steuerung für AAV9.....	67
3.3.2. Vergleich transduktionell und transkriptionell zielgerichteter AAV – Vektoren	68
3.3.3. Reduktion der MLC – Promotorsequenz	69
3.3.4. EGFP – Reportervektoren zur Lokalisation der Genexpression in transversalen Herzmuskelschnitten	71
3.3.5. Einfluss von Vektordosis und Promotor auf die Lebertransduktion	72
3.4. Ultraschall vermittelter kardialer Gentransfer von AAV – Vektoren in Ratten.....	73
3.4.1. Bindung der AAV – Vektoren an die Oberfläche von Mikrosphären	73
3.4.2. Evaluation der Gentransfereffizienz nach AAV – Mikrosphären – Applikation.....	75
3.4.3. Histologische Analyse der EGFP – Reportergenexpression im Herzen ..	76
3.5. Gentherapieansatz der Kardiomyopathie durch Gentransfer einer verkürzten Dystrophin cDNA in Dystrophin defiziente Mäuse.....	78
3.5.1. Expression des μ Dystrophins <i>in vitro</i>	78
3.5.2. Vektordosis abhängige Expression des μ Dystrophins <i>in vivo</i>	79

3.5.3. Histopathologische Validierung nach Gentransfer.....	83
3.5.4. Immunstatus nach Gentransfer	84
3.5.5. Altersabhängige Expression des μ Dystrophins <i>in vivo</i>	85
4. Diskussion	87
4.1. Verbesserung der Effizienz und Spezifität von AAV9 – Vektoren durch eine transkriptionelle Zielrichtung.....	87
4.1.1. Vorteile der Kombination aus gezielter Transduktion und Transkription....	87
4.1.2. Erhöhung der verpackbaren Transgengröße durch Reduktion der Promotorlänge.....	89
4.2. Ultraschall vermittelte Transduktion von AAV – Vektoren	90
4.2.1. Ultraschall gestützte Zerstörung von AAV beladenen Mikrosphären zur Effizienzsteigerung des kardialen Gentransfers	90
4.2.2. Grenzen und Sicherheit des Ultraschall – vermittelten kardialen Gentransfers.....	91
4.3. Substitution des Dystrophins voller Länge durch eine verkürzte cDNA 93	
4.3.1. Die kardiale Substitution des Dystrophins in Abhängigkeit der Vektordosis	93
4.3.2. Unvollständige Substitution des Dystrophins im Skelettmuskel.....	94
4.3.3. Die Substitution des Dystrophins in Abhängigkeit vom Alter	96
4.4. Charakterisierung des vorliegenden DMD^{mdx} – Stammes: genotypische und phänotypische Unterschiede zum Ursprungstamm.....	98
4.4.1. Phänotypische und genotypische Gegenüberstellung.....	98
4.4.2. Histopathologische Gegenüberstellung	99
4.4.3. Physiologische Parameter.....	103
4.5. Fazit.....	104
5. Literaturverzeichnis.....	106
6. Anhang	120
6.1. Abbildungsverzeichnis.....	120
6.2. Tabellenverzeichnis	121
6.3. Abkürzungsverzeichnis.....	121

ZUSAMMENFASSUNG

Die Duchenne Muskeldystrophie ist eine X – Chromosomal rezessive Erkrankung, welche durch den Verlust des Dystrophins zu einer Skelettmuskeldystrophie mit einer Beteiligung des Herzens (Kardiomyopathie) führen kann. Da konventionelle Therapien jedoch keine Heilung ermöglichen, könnte ein Gentransfer mittels Adeno-assoziiierter Viren (AAV), einen Therapieansatz darstellen. Daher wurde das Potential transkriptionell und transduktionell zielgerichteter AAV hinsichtlich der Effizienz und Spezifität bei systemischer Applikation in Mäusen untersucht. Die verwendete Kombination aus AAV9 und dem CMV verstärkten Myosin – Leichtketten - Promotor (CMV-MLC1.5kb) zeigte gegenüber AAV2(R484E;R585E) und CMV-MLC1.5kb eine höhere Transduktionseffizienz im Herzen. Im anschließenden Vergleich des CMV-MLC1.5kb mit dem unspezifischen CMV – Promotor konnte eine höhere transkriptionelle Effizienz und Spezifität zu Gunsten des kardial spezifischen Promotors erzielt werden. Als Voraussetzung zur Verpackung größerer Transgene in AAV wurde ein auf 260 Basenpaare (bp) verkürzter CMV-MLC hinsichtlich der Effizienz und Spezifität einer kardialen Transkription untersucht. Da die kardiale Transkriptionseffizienz im Vergleich zum CMV-MLC1.5kb unverändert war, wurde die Kombination aus CMV-MLC0.26kb und AAV9 für einen kardialen therapeutischen Gentransferansatz gewählt. Als Tiermodell diente die Duchenne Muskeldystrophie-Maus (Mdx), welche aufgrund einer X – chromosomalen Punktmutation eine Kardiomyopathie entwickelt. Aufgrund phänotypischer Unterschiede des in dieser Arbeit verwendeten Mausstammes zu dem in der Literatur beschriebenen Originalstamm, wurde eine Geno- und Phänotypisierung vorgenommen, um die Vergleichbarkeit beider Stämme zu untermauern. Auch wenn genomweit nur eine 75%ige Übereinstimmung beider Stämme erreicht werden konnte, so zeigte das X - Chromosom eine 100%ige Übereinstimmung mit dem Originalstamm. Auch bei weiteren Parametern, wie Histopathologie, Blutwerten und kardialen Funktionsmessungen, konnten keine gravierenden Abweichungen zum Originalstamm gezeigt werden, weshalb beide Linien als gleichwertig gelten. Daraufhin wurden die verfügbaren Mdx – Mäuse mit einer verkürzten Dystrophin cDNA (μ Dys), verpackt in AAV9 und unter der Kontrolle des CMV-MLC0.26kb - bzw. CMV -Promotors, systemisch behandelt. Im direkten Vergleich zeigte sich, dass der CMV-MLC0.26kb durch eine hohe Transduktionseffizienz des Herzens gegenüber dem CMV - Promotor überlegen ist. Selbst bei Tieren, welche in hohem Alter (42 Wochen) injiziert wurden, war eine erfolgreiche Expression des μ Dys unter Kontrolle des CMV-MLC0.26kb - Promotors zu beobachten. Um eine systemische Applikation in größeren Tieren und Menschen zu ermöglichen, wurde ein Gentransfer mit dem kardial spezifischen CMV-MLC1.5kb - Promotor in Ratten getestet. Dazu wurden mit AAV6 bzw. AAV9 beladene Mikrosphären durch Applikation eines transthorakalen Ultraschalls im Herzlumen zerstört. Dies führte im Vergleich zur systemischen Applikation ohne Mikrosphären zu einer höheren Spezifität und Effektivität der kardialen Transduktion. Die Sicherheit dieser Applikationsmethode konnte durch das Ausbleiben gewebespezifischer Komplikationen (Hämorrhagien, Arrhythmien) bestätigt werden. Somit könnte die Anwendung dieser Herzmuskel spezifischen Applikation in Kombination mit transkriptionell und transduktionell an das Zielgewebe angepassten AAV neue Wege in der Therapie von angeborenen Kardiomyopathien beim Menschen eröffnen.

SUMMARY

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a recessive X-linked disorder. Mutations within the dystrophin encoding gene can lead to a complete loss of the protein, causative for the Duchenne muscular dystrophy, frequently associated with severe cardiomyopathy. While conventional therapies can only alleviate the symptoms of the disorder temporarily, gene therapy approaches, like adeno-associated viral vector (AAV) – dependent gene transfer, may reconstitute the patients cardiac status. To achieve an enhanced cardiac specific gene delivery after systemic application in mice, transductionally and transcriptionally targeted AAV vectors have been tested. The combination of AAV serotype 9 (AAV9) and the CMV enhanced myosin light chain promoter (CMV-MLC1.5kb) leads to an increased cardiac reporter gene transduction superior to AAV2(R484E;R585E), a vector with reduced hepatic uptake due to ablation of binding the AAV2 primary receptor heparan-sulfate-proteoglycane. Furthermore, the combination of AAV9 and CMV-MLC1.5kb promoter revealed an increased cardiac transcription efficiency and specificity compared to the unspecific CMV promoter (CMV). In order to meet the packaging limit of double stranded AAV vectors the MLC promoter sequence was reduced to 260 base pairs (bp). Comparing luciferase activities in cardiac tissue of animals either injected with the CMV-enhanced MLC0.26kb promoter (CMV-MLC0.26kb) or the CMV-MLC1.5kb promoter resulted in a similar gene transfer efficiency. Due to the high efficiency and specificity of cardiac gene transfer with AAV9, the CMV-MLC0.26kb promoter was used for a therapeutic gene transfer to myocardium of mice. In order to investigate the benefit of therapeutic gene transfer, the Duchenne muscular dystrophy mouse (Mdx) was chosen as an animal model of an inherited cardiomyopathy. Comparing the available Mdx strain with the originally described Mdx strain revealed minor phenotypic differences between both strains. The genotyping resulted in only 75% genomic congruency. However, no differences were found for the X-chromosome, the origin of the dystrophin mutation. In addition, phenotypic studies of the accessible strain could not reveal major differences between the available strain and published data. After demonstrating the comparability of both strains, Mdx mice were systemically injected with AAV9 harbouring a truncated Dystrophin cDNA (μ Dys) under the transcriptional control of either the CMV-MLC0.26kb promoter or the CMV promoter. Direct comparison of both vector constructs revealed an efficient and cardiac specific expression of μ Dys with the CMV-MLC0.26kb promoter, that was superior to the CMV promoter. Even in 42 weeks old Mdx mice, an efficient and specific myocardial μ Dys expression could be observed after systemic application using the CMV-MLC0.26kb promoter. In order to enhance cardiac transduction in systemic application of larger animals or patients, AAV6 and AAV9 vectors harbouring a luciferase reporter gene under transcriptional control of the CMV-MLC1.5kb promoter were attached to gasfilled lipid bubbles (microbubbles). A constant transthoracic ultrasound was applied during AAV-loaded microbubble administration in rats. Thereby, the microbubbles burst within the cardiac vessels and facilitate transduction of the myocardium. In contrast to systemic application of AAV vectors in rats, the application of AAV-loaded microbubbles in combination with ultrasound revealed an increased efficiency and specificity of myocardial transduction. The absence of side effects (haemorrhagia, arrhythmia) after application of AAV-loaded microbubbles ensured the safety of this application method. In conclusion, the combination of a cardiac specific application method with transcriptionally and transductionally targeted AAV vectors may enable new approaches in therapy of inherited cardiomyopathies in men.

Originalarbeiten

Schinkel S, Leuchs B, Kleinschmidt JA, Katus HA, Müller OJ (2009) Novel heart-targeted adeno-associated virus vectors for efficient transvascular gene transfer in adult mice. *Cardiovasc Res* (eingereicht)

Goehringer C, Rutschow D, Bauer R, **Schinkel S**, Weichenhan D, Bekeredjian R, Straub V, Kleinschmidt JA, Katus HA, Müller OJ (2009) Prevention of cardiomyopathy in delta-sarcoglycan knockout mice after systemic transfer of targeted adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc Res* 82(3):404-10

Müller OJ, **Schinkel S**, Kleinschmidt JA, Katus HA, Bekeredjian R (2008). Augmentation of AAV-mediated cardiac gene transfer after systemic administration in adult rats. *Gene Ther* 15(23):1558-65

1. Einleitung

1.1. Duchenne Muskeldystrophie

1.1.1. Struktur und Funktion des Dystrophins

Als essentieller Teil des Dystrophin assoziierten Glykoproteinkomplexes (DAG-Komplex), welcher sowohl strukturell als auch durch Signalwege eine Verbindung zwischen extrazellulärer Matrix und intrazellulärem Aktin herstellt, spielt das humane Dystrophin eine besondere Rolle (Campbell and Kahl, 1989). Strukturell gesehen verknüpft das aus 3685 Aminosäuren (AS) bestehende, 427 kDa schwere Protein mittels der N – terminalen, 240 AS langen α – Aktin – Bindedomäne und den C – terminal gelegenen, 455 AS langen Dystroglykan – Syntrophin – Bindedomänen (Koenig *et al.*, 1988), das Aktingerüst der Zelle mit dem in der Plasmamembran befindlichen Dystrosarkoglykankomplex (Abb. 1.1). Das Dystrophin selbst besteht neben den bereits erwähnten Domänen aus einer zentralen Stabregion (Rod), gebildet durch 24 triplehelikale Elemente (3 Alpha-helices), unterbrochen von 4 Prolinreichen Domänen (Hinge), welche sich direkt an die N – terminale Domäne anschließt (Abb. 1.1). Gefolgt wird diese von der Cysteinreichen Domäne, welche neben der Dystroglykan – Bindedomäne auch noch potentielle Ca^{2+} - Bindestellen enthält. Synthetisiert wird das muskuläre Dystrophin, nach Transkription der 2,4 Mb des Xp21.2 – Locus, aus einer 79 Exone umfassenden, 14 kb großen mRNA (Nobile *et al.*, 1997). Die Regulation der Transkription übernehmen dabei sieben unabhängige, zelltypspezifische Promotoren (Mital *et al.*, 1998; Muntoni *et al.*, 2003), wovon drei Promotoren die Expression der Dystrophin Isoform voller Länge in Muskel, Nerven und Purkinjefasern steuern. Die vier intragenischen Promotoren hingegen regulieren die Expression kürzerer Isoformen in weiteren Geweben (Mital *et al.*, 1998; Muntoni *et al.*, 2003).

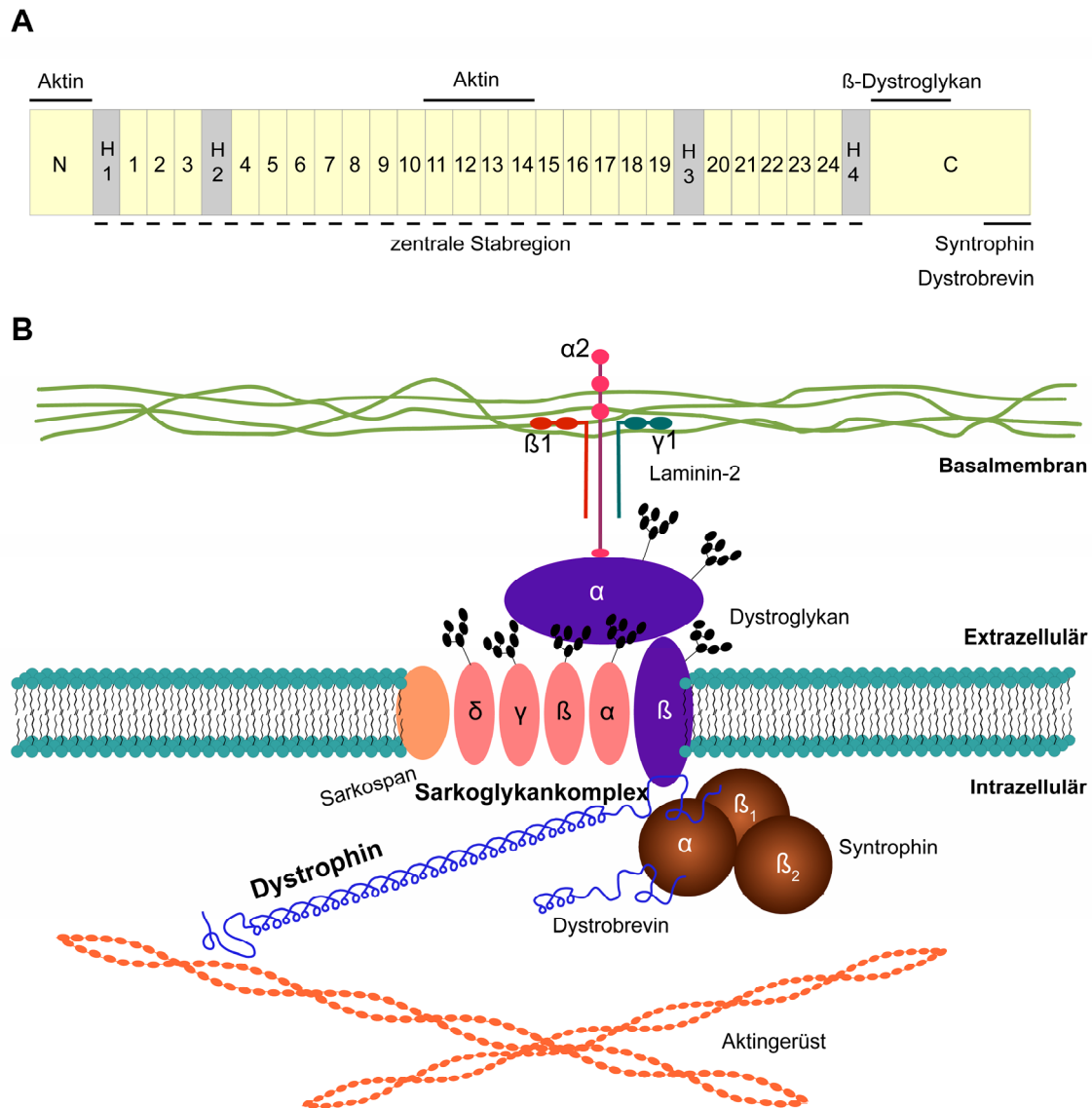


Abbildung 1.1: Übersicht über den Aufbau und Funktion des Dystrophins, nach (Wells *et al.*, 2002). **A** Aufteilung des Dystrophins in 4 Domänen. **B** Funktion des Dystrophins als Bindeglied zwischen Aktin und Plasmamembran. H = Scharnierregion (Hinge), 1-24 = zentrale Stabregionselemente, N = Aminoterminus, C = Carboxyterminus.

1.1.2. Klinischer Verlauf der Duchenne Muskeldystrophie

Die Dystrophin assoziierte Muskeldystrophie ist eine X – chromosomal rezessive Erkrankung (12q21, Xp21.2 – Locus), die je nach molekularer Veränderung des Dystrophingens in die milde Becker Muskeldystrophie (BMD) oder die schwere Duchenne Muskeldystrophie (DMD) unterteilt werden kann. Dabei ist die DMD, mit einer weltweiten Inzidenz von 1:3500 in neugeborenen Jungen, die häufigste Form einer lethalen Muskeldystrophie (England *et al.*, 1990; Biggar *et al.*, 2001; Metules, 2002; K. R. Wagner, 2002). Erstmals beschrieben wurde diese Krankheit in Bailliere et Fils im Jahre 1862 von Guillaume-Benjamin Duchenne, der Untersuchungen zur

Elektrotherapie durchführte. Charakterisiert ist die DMD vor allem durch den progressiven Verlust der Skelettmuskulatur, deren erste Anzeichen, wie Ungeschicklichkeit, gehäufte Stürze oder Probleme beim Treppensteigen sich bereits im Alter von 2 – 5 Jahren bemerkbar machen (Roland, 2000). Ab etwa dem fünften Lebensjahr setzt, mit dem Abbau der Muskulatur des Schultergürtels beginnend, eine zunehmende Bewegungseinschränkung ein, welche meist zur raschen Rollstuhlpflichtigkeit der Patienten führt (Brooke *et al.*, 1989; McDonald *et al.*, 1995). Zusätzlich zur Einschränkung der Mobilität der Patienten kommt es zu Wirbelsäulendeformationen (insbesondere Kyphoskoliosen) und durch Schwäche der Atemmuskulatur zu respiratorischer Insuffizienz (Biggar *et al.*, 2001; K. R. Wagner, 2002). Neurologische Veränderungen, welche durch Abwesenheit der im Hirn exprimierten Isoform des Dystrophin verursacht werden und durch verminderte Intelligenz und daraus resultierendem Aufmerksamkeitsverlust gekennzeichnet sind, treten bei 30% aller DMD Patienten auf (Billard *et al.*, 1998; Culligan and Ohlendieck, 2002). Trotz aktuell deutlich verbesserter Allgemeinmassnahmen mit Physiotherapie, Infektophylaxe, häuslicher Überdruckbeatmung und medikamentöser Therapie der Hermuskelschwäche versterben DMD Patienten meist in der 2. - 3. Lebensdekade (Boland *et al.*, 1996; Emery, 1998; Eagle *et al.*, 2007).

1.1.3. Genetische Grundlagen der Duchenne Muskeldystrophie

Die genetischen Grundlagen der DMD, welche zum Verlust des Dystrophins führen, können vielfältiger Natur sein. Während 30% aller DMD Erkrankungen durch Spontanmutationen entstehen (Mital *et al.*, 1998), sind die mit 70% am häufigsten auftretenden Veränderungen im Dystrophingen Leserasterverschiebende Deletionen einzelner oder mehrerer Exons und in geringeren Prozentsätzen nonsense – Mutationen und Duplikationen (Emery, 2002; Nishino and Ozawa, 2002). Da die genetischen Veränderungen einen direkten Einfluss auf die Ausprägung des Phänotyps der Patienten haben, ist es von essentieller Bedeutung, die zu Grunde liegende genetische Variation zu analysieren (Flanigan *et al.*, 2003; Nowak and Davies, 2004). In der Regel führen Mutationen welche keine Leserasterverschiebung hervorrufen, durch die Produktion eines verkürzten aber teilweise funktionstüchtigen Dystrophinproteins, zu einem wesentlich milderen klinischen Phänotyp, der Muskeldystrophie vom Typ Becker (Kakulas, 1999).

1.1.4. Histopathologische Veränderungen

Auf pathologischer Ebene wird das Ausmaß der Dystrophie anhand vermehrt nachzuweisender Areale nekrotischer und degenerierender Muskelfasern sichtbar, welche in der Regel von Zellen des Immunsystems umgeben sind (McDouall *et al.*, 1990). Zusätzlich zu den nekrotischen Zellen sind vor allem bei jungen Patienten kleine regenerierende Muskelfasern (gekennzeichnet durch die Kernlage zur Mitte hin) zu erkennen (Schmalbruch, 1984), deren Zahl mit zunehmendem Alter der Patienten abnehmen und durch Binde- und Fettgewebe ersetzt werden (Fenoglio *et al.*, 1983). Der Mechanismus durch den der Verlust des Dystrophins zur progredienten Muskeldegeneration führt und die genannten pathophysiologischen Veränderungen bedingt, ist nicht vollständig geklärt und lässt mehrere Hypothesen zu. Unter anderem scheint die durch den unvollständigen Aufbau des gesamten Dystrophin assoziierten Proteinkomplexes gestörte Integrität der Plasmamembran sowie die Dissoziation vom Zytoskelett Ursache für das Auftreten eines kontraktionsinduzierten Zellschadens zu sein (Pardo *et al.*, 1983; Moens *et al.*, 1993; Petrof *et al.*, 1993; Head *et al.*, 1994; Campbell, 1995; Williams and Bloch, 1999; Rybakova *et al.*, 2000). Die erhöhte Durchlässigkeit der geschädigten Plasmamembran kann durch die zytoplasmatische Akkumulation muskelfaserfremder Komponenten, wie Albumin und Immunglobuline, als auch durch die bei erhöhter Membranfragilität ermöglichte Aufnahme von Farbstoffen (z.B. Evans Blue) in die Muskelzelle nachgewiesen werden (Bradley and Fulthorpe, 1978; Clarke *et al.*, 1993; Straub *et al.*, 1997; Straub *et al.*, 2000). Auch die oben erwähnte These, dass anhaltende mechanische Belastungen zur erhöhten Muskelzellschaden führen, konnte durch tierexperimentelle Studien gezeigt werden (N. Deconinck *et al.*, 1996; Brussee *et al.*, 1997; Tinsley *et al.*, 1998; Hamer *et al.*, 2002). Dabei führte die experimentelle Erhöhung der physischen Aktivität im Mausmodell für DMD (Mdx - Maus) zu vermehrter Schädigung der Plasmamembran und somit zu einer gesteigerten Aufnahme des Evans blue Farbstoffes in Skelett- und Herzmuskelzellen. Das dazu konträre Experiment resultierte, durch eine Immobilisation der Mdx - Maus mittels intramuskuläre Toxininjektion (Tetanustoxin), dementsprechend in einer Reduktion der Muskeldystrophie (Mizuno, 1992; Mokhtarian *et al.*, 1999).

Als Folge der Membranschädigung werden vor allem anhaltende inflammatorische Prozesse im dystrophen Muskel für den progredienten Verlauf der DMD

verantwortlich gemacht. Hinweise darauf ergab die Bestimmung verschiedener Populationen von Immunzellen in Muskeln von DMD Patienten (Fielding *et al.*, 1993; Malm *et al.*, 2000; Stupka *et al.*, 2001). Es zeigte sich, dass die inflammatorischen Prozesse in Muskeln in den ersten 12 Stunden nach übermäßiger Anstrengung zunächst durch Invasion von neutrophilen Granulozyten charakterisiert sind (Tidball *et al.*, 1999) und sich eine lang anhaltenden Invasion von Makrophagen anschliesst (St Pierre and Tidball, 1994). Insbesondere für die neutrophilen Granulozyten wurde ein Zusammenhang zwischen Ausmass der Invasion und Grad der Muskelschädigung (bestimmt durch den Anstieg der Kreatinkinase) beobachtet (Fielding *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1999). Als Ursache, des durch neutrophile Granulozyten verursachten Anstiegs von Sarkolemmmläsionen, gelten vor allem Mechanismen, welche durch die Freisetzung von freien Radikalen vermittelt werden. Bestätigt wird dies durch Muskelischämie – Untersuchungen bei Nagern, in denen die neutrophilen Granulozyten vor Reperfusion der Muskeln depletiert oder Radikalfänger appliziert worden waren (Jolly *et al.*, 1986; Korthuis *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1989; Cambria *et al.*, 1991; Formigli *et al.*, 1992). Im Gegensatz dazu greifen, wie aus Arbeiten an Mdx – Mäusen bekannt ist, infiltrierende, zytotoxische Makrophagen aktiv in die Zerstörung der Muskelzellen ein (Wehling *et al.*, 2001). Somit konnte gezeigt werden, dass die DMD primär durch den Verlust des Dystrophins bedingt wird, zusätzlich aber sekundäre Prozesse einen erheblichen Einfluß auf den Verlauf der Krankheit nehmen.

1.1.5. Therapie der Duchenne Muskeldystrophie

Bis zum heutigen Tage werden mögliche Therapiestrategien zur Behandlung von DMD Patienten kontrovers diskutiert. Einzig der Einsatz von Glukokortikosteroiden, welche durch die immunsuppressive und entzündungshemmende Wirkung nicht nur einen positiven Effekt auf die Muskelstärke der Patienten hat (Biggar *et al.*, 2006; King *et al.*, 2007), sondern auch die kardiorespiratorische Funktion präserviert (Biggar *et al.*, 2001; Silversides *et al.*, 2003). Bekannteste Vertreter dieser Wirkstoffklasse sind Prednison und Deflazacort, welche den Patienten in der Regel in einer Dosis von 0,75 mg/kg/Tag bzw. 0,9 mg/kg/Tag verabreicht werden (Bonifati *et al.*, 2000). In Untersuchungen zu möglichen Nebeneffekten beider Präparate, wie Gewichtszunahme, Stimmungsschwankungen und Osteoporose (Manzur *et al.*, 2004), konnte eine verringerte Ausprägung der Nebeneffekte für eine Therapie mit

Deflazacort festgestellt werden (Angelini *et al.*, 1994; Biggar *et al.*, 2001). Durch Therapie mit Glukokortikoiden kann zwar die Progredienz der Erkrankung verlangsamt werden, einen kausalen Therapieansatz zur Heilung von DMD stellt sie jedoch nicht dar. Aus diesem Grund ist es von essentieller Bedeutung, dass innovative und potente Therapiekonzepte für Patienten mit DMD entwickelt werden. Als einen vielversprechenden Ansatz in der Therapie der DMD ist daher die virale Gentherapie zu nennen, deren Ziel es ist, mit Hilfe replikationsdefizienter viraler Vektoren das fehlende Dystrophin wiederherzustellen. So wurde in einem Experiment, mit Hilfe von Adenoviren, eine verkürzte humane Dystrophin - cDNA in die Muskulatur neonataler Mdx – Mäuse (Kap. 1.2.4.) eingebracht, was zu einer dauerhaft korrekten Lokalisation des Dystrophin an der Plasmamembran führte (Ragot *et al.*, 1993). Allerdings konnte in weiterführenden Untersuchungen eine starke, durch das Adenovirus verursachte, Zytotoxie und Aktivierung des Immunsystems verzeichnet werden, welche als schwerwiegendste Komplikation den Tod des Tieres zur Folge hatte (Muruve *et al.*, 1999; Stilwell *et al.*, 2003; Brunetti-Pierri *et al.*, 2004; Muruve *et al.*, 2004; Palmert *et al.*, 2004). Aus diesem Grund wurden apathogene virale Vektoren etabliert, deren Basis das Adeno-assoziierte Virus (AAV) ist. Dabei erwiesen sich vor allem die AAV - Serotypen 1, 5, 6 und 8 als geeignet für einen erfolgreichen und langanhaltenden systemischen Gentransfer in die Skelettmuskulatur von Nagern (Chao *et al.*, 2000; Duan *et al.*, 2001; Auricchio *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2005). Nach Untersuchungen zum Gentransfer in verschiedenen Tiermodellen kristallisierte sich durch die niedrige Immunogenität und ausbleibende Toxizität der AAV der entscheidende Vorteil gegenüber anderen Vektoren heraus (J. A. Wagner *et al.*, 2002; Manno *et al.*, 2003; Arruda *et al.*, 2004; Moss *et al.*, 2004). Daraus resultierend erfolgte eine klinische Studie Phase I mit einer im AAV – Vektor inkorporierten verkürzten Dystrophin – cDNA, welche durch intramuskuläre lokale Injektion in den Biceps appliziert wurde (ClinicalTrials.gov; NCT00428935). Der Ausgang dieser klinischen Studie könnte durch essentielle Aussagen bezüglich Verträglichkeit, Immunantwort und Spezifität den Grundstein für eine AAV – vermittelte Therapie bei DMD legen.

Ebenfalls vielversprechend, und bereits in einer offenen Studie an vier Patienten untersucht, ist die Verwendung von antisense Oligonukleotiden (AON) (van Deutekom *et al.*, 2007). Dabei greifen AON aktiv in die post translationalen Modifikationen der prä – mRNA ein, indem sie beim Spleißen die, das mutierte Exon

flankierende Spleißregion maskieren, wodurch der Spleißapparat das mutierte Exon herausschneidet („Exon - skipping“) (Bremmer-Bout *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Denti *et al.*, 2006). Das Ergebnis der obigen offenen Patientenstudie mit AON war aber ernüchternd, so konnte nach lokaler Injektion der AON in den *Musculus tibialis anterior* in nur 17 - 35% der Muskelfasern eine Präsenz des Dystrophins nachgewiesen werden (van Deutekom *et al.*, 2007).

Da 10 – 15% der DMD Patienten eine nonsense Mutation tragen, welche zur Entstehung eines frühzeitigen Stoppcodons führt, wurde eine weitere Möglichkeit getestet, die mittels Aminoglykosid – Antibiotika (Gentamicin), ein „Überlesen“ des frühzeitigen Stoppcodons am Ribosom zu erwirken (K. R. Wagner *et al.*, 2001). Jedoch reichte die Effizienz dieses Ansatzes nicht aus um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Ein neuer Versuch in dieser Richtung ist die klinische Erprobung eines, durch eine Hochdurchsatzselektion identifiziertes Molekül (PTC 124), welches sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Expression des Dystrophins durch „Überlesen“ wieder herstellen konnte ((Hirawat *et al.*, 2007; Welch *et al.*, 2007) ClinicalTrials.gov; NCT00592553).

Zusätzlich zu den genetischen und post - translationalen Therapieansätzen wird vor allem auf der Ebene des Muskelwachstums und der Muskelregeneration versucht neue Wege für eine Therapie zu finden. Grundlage dafür ist die inhärente Muskelregeneration aus ortsansässigen Stammzellvorläufern, welche bei DMD aber unvollständig abläuft und somit die Bildung von Nekrosen und Fibrosen begünstigt (Kap. 1.1.2.). Die postnatale Regeneration der Muskelfasern wird dabei von einer Vielzahl endogener Wachstumsfaktoren beeinflusst. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist der „Insulin - ähnliche Wachstumsfaktor I“ (IGF-1 = insulin-like growth factor), welcher vor allem die Proliferation und Differenzierung der Muskelvorläuferzellen fördert (Rosenthal and Cheng, 1995; Engert *et al.*, 1996). Aus vielversprechenden Versuchen an Nagern, welchen IGF-1 postnatal subcutan appliziert wurde und anschließend eine Verbesserung der Muskelkraft verzeichnet werden konnte (Barton *et al.*, 2002; Gregorevic *et al.*, 2002), entstand so eine klinische Studie (Phase II), die versucht durch IGF-1 die Muskelkraft der Patienten zu erhöhen (ClinicalTrials.gov; NCT00577577). Dabei ist anzumerken, dass auch bei dieser Art von Therapie zwar keine Heilung der DMD erreicht wird, jedoch die Lebensqualität der Patienten erheblich gesteigert werden könnte.

Für eine dauerhafte Verbesserung des Status oder Heilung der Patienten, auch im Hinblick auf die bereits bestehenden Nebenwirkungen der momentanen Medikamentierung, ist die Rekonstruktion des Dystrophin assoziierten Glykoproteinkomplexes durch virale Gentherapie mit verkürzten Dystrophin cDNA's und antisense Oligonukleotiden am vielversprechendsten.

1.2. Die dilatative Kardiomyopathie

1.2.1. Definition und Klassifikation von Kardiomyopathien

Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Myokards, welche mit einer kardialen Dysfunktion assoziiert sind, die wiederum zum progressiven Herzversagen oder Herztod führen kann (WHO, 2002; (Maron *et al.*, 2006)). Da die Ursachen für eine Kardiomyopathie vielfältiger Natur sind, werden diese Kardiomyopathien je nach Ursache und Art der Dysfunktion klassifiziert. In einer ersten Aufteilung unterscheidet man zwischen einer primären Kardiomyopathie, welche vornehmlich auf das Herz beschränkt ist und einer sekundären Kardiomyopathie, deren Herzdysfunktion auf einer generalisierten Grunderkrankung basiert (Maron *et al.*, 2006). Die primäre Kardiomyopathie wiederum kann in drei verschiedene Gruppen unterteilt werden (Abb. 1.2).

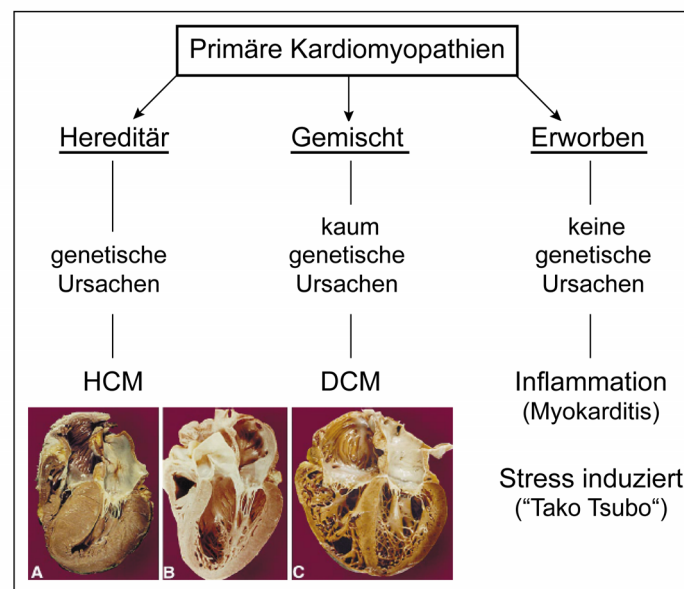


Abbildung 1.2: Aufteilung der primären Kardiomyopathien nach (Maron *et al.*, 2006) und (Seidman and Seidman, 2001). Die Unterteilung erfolgt je nach Ursache in hereditäre, gemischte oder erworbene Kardiomyopathie. Dabei entspricht **A** dem Bild eines hypertrophen, **B** dem eines normalen und **C** eines dilatierten Herzens.

Die erste Gruppe, klassifiziert als hereditäre Kardiomyopathie, definiert sich durch Erkrankungen des Herzmuskels welche nicht auf einen ischämischen bzw. hämodynamischen Defekt, wie Myokardinfarkt oder Klappenfehler zurück zu führen sind, sondern genetische Veränderungen zur Grundlage hat. Die bekannteste Erkrankung ist dabei die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), welche mit einer Inzidenz von 1:500 bei jungen Menschen die am häufigsten auftretende primäre Kardiomyopathie ist und vor allem durch Vergrößerung der Ventrikelwanddicke auffällt (Abb. 1.2, A) (Maron *et al.*, 2006). Der erworbenen Kardiomyopathie werden alle Erkrankungen zugeordnet, welche keinerlei genetische Ursachen haben. Gründe für das Entstehen einer Kardiomyopathie sind hier zum Beispiel durch Viren verursachte Inflammationen (Myokarditis) oder Stress („Tako - Tsubo“ - Kardiomyopathie). Die Gruppe der gemischten Kardiomyopathien umfasst Erkrankungen des Herzens, deren Ursachen sowohl hereditärer als auch erworben klassifiziert werden können. Das bekannteste Beispiel einer gemischten Kardiomyopathie ist die dilatative Kardiomyopathie (DCM), welche durch ventrikuläre Vergrößerung (Abb. 1.2, C) und systolische Dysfunktion gekennzeichnet ist (Maron *et al.*, 2006). Die Inzidenz für eine genetische Beteiligung bei einer DCM liegt in einem Bereich von 20 – 35% und wird durch Mutationen in den für Proteine des kontraktilen Apparates von Muskelzellen kodierenden Genen verursacht (Grunig *et al.*, 1998). Eine Sonderstellung nimmt dabei die durch die Duchenne Muskeldystrophie verursachte DCM ein, die aufgrund der neuromuskulären Erkrankung sowohl zu den primären gemischten Kardiomyopathien als auch zu den sekundären Kardiomyopathien zählt, da sie als Teil einer generalisierten Erkrankung auftritt.

1.2.2. Die dilatative Kardiomyopathie bei Duchenne Muskeldystrophie

Die kardiale Beteiligung bei Duchenne Muskeldystrophie (DMD) wurde erstmalig im Jahre 1836 durch Conte und Gioia erwähnt und später durch erste elektrokardiographische Untersuchungen bestätigt (Rubin, 1952). Da 10 - 20% der DMD Patienten im späten Stadium der Krankheit an Herzversagen sterben (Farah *et al.*, 1980), war es nötig, eine genauere Charakterisierung der kardialen Beteiligung durch verschiedenste Methoden in vielfältigen Studien vorzunehmen. Eine diagnostische Methode ist dabei das Elektrokardiogramm (EKG), welches Auskunft über die Ausbreitung der elektrischen Erregung über Vorhof und Ventrikelmyokard

gibt. Die dabei am häufigsten auftretende Veränderung bei DMD ist eine Sinustachykardie (Herzschlag in Ruhe $>100/\text{min}$) (K. Ishikawa, 1997). Grundlage der Sinustachykardie könnte eine autonome Störung des Parasympathicus bei DMD Patienten sein (Lanza *et al.*, 2001). Sehr häufige zu beobachten, bei 66% bzw. 58% der verstorbenen Patienten, sind komplexe ventrikuläre Arrhythmien und ektopische Kontraktionen des linken Ventrikels ab dem 15. Lebensjahr der Patienten, welche zu einer linksventrikulären systolischen Dysfunktion führen (Chenard *et al.*, 1993; Quinlivan *et al.*, 1996). Zur weiteren Charakterisierung der kardialen Dysfunktionen, im speziellen die des linken Ventrikels, wird vor allem das Echokardiogramm genutzt, welches Auskunft über die Dicke, regionale Wandbewegungen, eventuelle Dilatationen und systolische/diastolische Dysfunktionen der Ventrikel gibt. Dabei stellte sich in einer Patientenstudie heraus, dass vor allem kardiale Veränderungen des linken Ventrikels bei nahezu allen der über 18-jährigen Patienten auftreten und in 35% der Fälle zu einer linksventrikulären dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führen, an der ca. 27% der Patienten versterben (Nigro *et al.*, 1990; Corrado *et al.*, 2002). Der wohl wichtigste diagnostische Parameter zur Mortalitätsprognose ist die fraktionelle Verkürzung des linken Ventrikels (Kap. 2.2.5.4.), welche bei der DMD vornehmlich die Beeinträchtigung der systolischen Funktion widerspiegelt und zwei Jahre vor dem Versterben der Patienten stetig abnimmt (Nagai, 1989; Takenaka *et al.*, 1993). Gekennzeichnet ist die linksventrikuläre Dilatation bei DMD vor allem durch erhöhte regionale Wandbewegungsanomalien des Apex und des posterioren Myokard, welche sich im progressiven Verlauf der Krankheit über den gesamten linken Ventrikel ausbreiten und zu einer eingeschränkten Funktion des linken Ventrikels führt (Sasaki *et al.*, 1998; Lanza *et al.*, 2001). Auf histologischer Ebene wird die Ursache für die entstehende dilatative Kardiomyopathie sichtbar. Dabei beginnen die degenerativen Veränderungen des Myokards, analog zu den Beobachtungen aus dem Echokardiogramm, im posterobasalen Teil des linken Ventrikels, wovon sie sich in den gesamten linken Ventrikels ausbreiten (Frankel and Rosser, 1976). Gekennzeichnet sind diese Veränderungen vor allem durch atrophische Kardiomyozyten (zu erkennen am Verlust der Querstreifung und nukleären Degeneration), starke Fibrosen und Einlagerung von Fettzellen im Bereich degenerierter Kardiomyozyten (James, 1962; Frankel and Rosser, 1976; Moriuchi *et al.*, 1991).

Auch wenn die eben beschriebenen degenerativen Veränderungen am Herzen in 80% der DMD Patienten mit kardialer Beteiligung ohne Symptome bleiben (Nigro *et al.*, 1990), so versterben 20% der Betroffenen aufgrund fehlender effektiver therapeutischer Maßnahmen (Doing *et al.*, 2002). Zwar kann die Anwendung von ACE – Hemmern (Angiotensin Converting Enzyme, vasodilatative Wirkung) und β – Blockern (bradykarde Wirkung) bei DMD bedingter dilatativer Kardiomyopathie die Lebensspanne der Patienten erhöhen (Y. Ishikawa *et al.*, 1995; Melacini *et al.*, 1996; Y. Ishikawa *et al.*, 1999), doch ist es mit den bestehenden therapeutischen Mitteln nicht möglich den Patienten dauerhaft zu helfen oder eine Heilung anzubieten, weshalb neue therapeutische Wege beschritten werden müssen.

1.2.3. Tiermodelle genetisch bedingter dilatativer Kardiomyopathien

Ursächlich bei der Entstehung einer Vielzahl an neuromuskulären Erkrankungen mit kardialer Beteiligung (meist im Sinne einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM)) sind Mutationen in Genen, welche für Proteine des Dystrophin assoziierten Glykoproteinkomplexes (DAG-Komplex) und das Dystrophin kodieren (Kap. 1.1.1.). Das am Besten charakterisierte Modell ist die Mdx – Maus (Muskeldystrophie vom Typ Duchenne X – Chromosomal = Mdx), welche, aufgrund einer Punktmutation im Exon 23 des kodierenden Gens, eine komplette Defizienz des Dystrophin aufweist (Sicinski *et al.*, 1989). Generell zeigt die Mdx - Maus einen, im Vergleich zum Patienten, eher milden Phänotyp der Muskeldystrophie (Tab. 1.1), welcher durch eine ausgiebige Muskelregeneration sowie weitestgehend normale Lebenserwartung (über 1 Jahr) gekennzeichnet ist (Dangain and Vrbova, 1984; Durbeej and Campbell, 2002). Im Gegensatz zu den DMD – Patienten, welche bereits im Kindesalter erste kardiale Veränderungen aufweisen können, manifestiert sich eine Kardiomyopathie bei der Mdx – Maus erst in einem höheren Alter von ca. sechs Monaten (Bridges, 1986; Quinlan *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2009). Ursache für die Entstehung des eher milden Phänotyps könnte eine kompensatorische Überexpression des Dystrophin - homologen Proteins Utrophin sein. Die zusätzliche Abwesenheit von Utrophin bei Mdx - Mäusen (*utrn*^{-/-}/mdx, Tab. 1.1) führt dabei zu einer Annäherung des Phänotyps an den des Menschen. Typische Merkmale dieser Mäuse sind die Entstehung von Kyphoskoliose, Kardiomyopathie und Muskelschwäche, sowie eine reduzierte Lebenserwartung (ca. 20 Wochen) (A. E. Deconinck *et al.*, 1997; Grady *et al.*, 1997). Zwar gibt es noch weitere, durch Mutagenesen erzeugte Linien der Mdx

($Mdx^{2cv-5cv}$), jedoch ähneln diese in Art und Ausprägung der Muskeldystrophie und Kardiomyopathie der des Originalstammes (Im *et al.*, 1996; Araki *et al.*, 1997). Viel ausgeprägter und somit näher am Phänotyp der Duchenne Muskeldystrophie des Menschen ist das canine Modell der Muskeldystrophie – Golden Retrievers (GRMD). Dessen myokardiale Beteiligung ist durch eine progressive systolische Dysfunktion und linksventrikuläre Dilatation gekennzeichnet (Valentine *et al.*, 1988; Moise *et al.*, 1991; Ambrosio *et al.*, 2008).

Zusammenstellung von Mausmodellen mit Defekten im DAG-Komplex

Genotyp	Protein	Lebenserwartung	Muskeldystrophie	Kardiomyopathie
$Sgca^{-/-}$	α -Sarkoglykan	> 1 Jahr	moderat	keine
$Sgcb^{-/-}$	β -Sarkoglykan	> 1 Jahr	stark ausgeprägt	stark ausgeprägt
$Sgcd^{-/-}$	δ -Sarkoglykan	> 1 Jahr	stark ausgeprägt	stark ausgeprägt
Mdx	Dystrophin	> 1 Jahr	mild/moderat	mild
$Mdx^{2cv-5cv}$	Dystrophin	> 1 Jahr	mild/moderat	mild
$Utrn^{-/-}/mdx$	Utrophin, Dystrophin	4-20 Wochen	stark ausgeprägt	stark ausgeprägt
$Adbn^{-/-}$	α -Dystrobrevin	> 1 Jahr	mild	mild

Tabelle 1.1: Übersicht über genetische Mausmodelle mit Defekten in Bestandteilen des DAG-Komplexes und deren Ausprägung einer Kardiomyopathie, zusammengefasst nach (Durbeej and Campbell, 2002). Die Unterteilung der Tiere erfolgte anhand der betroffenen Proteine des Dystrophin assoziierten Glykoproteinkomplexes.

Der Sarkoglykan – Komplex ist ein wesentlicher Bestandteil des DAG-Komplexes (Abb. 1.1) Deshalb führen Mutationen in Genen, welche für Proteine des Sarkoglykan – Komplexes kodieren, im Speziellen die der α -, β -, γ - und δ -Sarkoglykane, zum klinischen Bild der Gliedergürtelmuskeldystrophien, welche unter dem Begriff Sarkoglykanopathien zusammengefasst werden (Roberds *et al.*, 1994; Bonnemant *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 1995; Noguchi *et al.*, 1995). Speziell β - und δ -Sarkoglykan – Nullmäuse ($Sgcb$, $Sgcd$; Tab. 1.1) entwickeln dabei eine schwere Muskeldystrophie und eine progressive dilatative Kardiomyopathie, welche frühzeitig durch große nekrotische und fibrotische Areale pathologisch auffällig wird (Coral-Vazquez *et al.*, 1999; Cohn *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu weisen α -Sarkoglykan defiziente Mäuse ($Sgca$) keinerlei Anzeichen einer Kardiomyopathie auf (Durbeej and Campbell, 2002). Ausgehend von den eben beschriebenen Modellen, kann daraus geschlossen werden, dass die Ausprägung einer Kardiomyopathie nicht nur von der Mutation eines bestimmten Gens bestimmt wird, sondern auch von der Spezies abhängig ist.

1.2.4. Duchenne Muskeldystrophie Maus

Als natürlich auftretende Mutation in einer Kolonie von C57BL/10 – Mäusen, wurde die C57BL/10ScSn-DMD^{mdx}/J (Mdx = Muskuläre Dystrophie X – Chromosomal) das erste Mal 1984 beschrieben (Bulfield *et al.*, 1984) und ist in ihrer phänotypischen Ausprägung einer Duchenne Muskeldystrophie (DMD) ähnlich (Bulfield *et al.*, 1984; Bridges, 1986). Zwar zeigen die Tiere in erster Linie eine kaum verringerte Lebenserwartung (Chamberlain *et al.*, 2007), jedoch sind deutliche histopathologische und funktionelle Veränderungen der quergestreiften Muskulatur vorhanden. Aus histopathologischer Sicht beginnt die Muskeldystrophie der Mdx – Maus mit einer nekrotischen, von einer Makrophageninfiltration begleiteten, Degeneration der Muskelfasern bereits in einem Alter von 2 - 8 Wochen (Anderson *et al.*, 1987; Torres and Duchon, 1987; Cooper, 1989; McGeachie *et al.*, 1993; Wehling *et al.*, 2001). Dabei wird die Degeneration der Muskulatur von einem Anstieg, der nach Nekrose aus dem Zytoplasma der Muskelzelle freigesetzten, Muskelkreatinkinase (Kap. 2.2.5.3.) begleitet, deren maximale Freisetzung im Alter von 5 Wochen erreicht wird (Glesby *et al.*, 1988). Trotz der vielen Gemeinsamkeiten mit der humanen DMD, zeichnen sich auf histopathologischer Ebene auch Differenzen zur Mdx - Maus ab. So kommt es bei der Mdx - Maus zwar zu einer alterabhängigen Fibrose des Skelettmuskels, jedoch ist diese im Vergleich zu DMD – Patienten milder (Tanabe *et al.*, 1986; Anderson *et al.*, 1987; Torres and Duchon, 1987; Coulton *et al.*, 1988; Marshall *et al.*, 1989). Eine weitere, nicht unumstrittene Differenz betrifft die Einlagerung von Fettgewebe in der dystrophischen Muskulatur der Mdx - Maus, welche zwar bei DMD – Patienten, aber nicht bei Mdx - Mäusen zu finden sein sollte ((Cooper, 1989); persönliche Korrespondenz mit Dr. Ralf Bauer).

Die zur Degeneration gleichzeitig ablaufende Regeneration der Muskelfasern ist vor allem durch die veränderte Lage des Nukleus zur Zellmitte hin und die Heterogenität des Muskelzelldurchmessers der sich neu differenzierenden Myozyten gekennzeichnet (Grounds and Torrisi, 2004; Messina *et al.*, 2006). Anders als bei DMD nimmt die Regeneration der Muskelfasern mit zunehmendem Alter der Mdx - Maus zu, was sich vor allem an der abfallenden Menge der ins Blut freigesetzten Muskelkreatinkinase und Abnahme der Nekrosen widerspiegelt (Tanabe *et al.*, 1986; Anderson *et al.*, 1987; Torres and Duchon, 1987; Woo *et al.*, 1987; Karpati *et al.*, 1988).

Funktionell ist für die Skelettmuskulatur der Mdx – Maus vor allem eine Reduktion der Kontraktionskraft beschrieben, über deren Ausmaß aber unterschiedliche Angaben gemacht werden (Willmann *et al.*, 2009). Grund dafür könnten methodische Probleme und die Verwendung unterschiedlicher Mauslinien sein (Gayraud *et al.*, 2007).

Neben den funktionellen und pathologischen Veränderungen der Skelettmuskulatur sind Veränderungen der Herzmuskulatur wichtige Faktoren in der Betrachtung der DMD (Kap. 1.2.2.). Somit stellt sich bei der Mdx - Maus als Modell der DMD oder präziser der Dystrophindefizienz ebenfalls die Frage nach kardialen Pathologien und deren Vergleichbarkeit zur DMD. Aus histopathologischer Sicht sind vor allem Läsionen im Myokard zu nennen, welche analog zur DMD durch Degeneration und Nekrose der Kardiomyozyten entstehen (Raymackers *et al.*, 2003; Messina *et al.*, 2006). Die direkte Folge der Degeneration des Gewebes ist die von einer progressiven Fibrose begleitete Inflammation des nekrotischen Gewebes (Quinlan *et al.*, 2004; Wehling-Henricks *et al.*, 2005; Van Erp *et al.*, 2006; Cohn *et al.*, 2007; Buyse *et al.*, 2009). Allerdings ist auch hier anzumerken, dass die Angaben zu den kardialen morphologischen Veränderungen, je nach untersuchtem Mdx – Mausstamm und der verwendeten Analysemethode, voneinander abweichen können (Cooper, 1989).

Analog zum Menschen sind die Auswirkungen der pathologischen Veränderungen des Herzmuskels der Mdx - Maus altersabhängig. Zwar ist ein verändertes EKG der Mdx - Maus und DMD – Patienten bereits in einem frühen Alter zu beobachten, die klinische Manifestation einer linksventrikulären dilatativen Kardiomyopathie erfolgt jedoch erst im fortgeschrittenen Alter der Patienten und der Mdx – Maus (über 6 Monate) (Bia *et al.*, 1999; Quinlan *et al.*, 2004; Wehling-Henricks *et al.*, 2005; Wilding *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2009).

Es lässt sich zusammenfassen, dass der Phänotyp der Mdx - Maus in einigen Aspekten der Pathophysiologie nur bedingt kongruent zum klinischen Bild eines Duchenne Muskeldystrophie Patienten ist. Dennoch ist die Mdx - Maus, insbesondere durch die genotypische Homologie zur DMD, ein interessantes Modell, um vorklinische Langzeitstudien zur Therapie des Herz – und Skelettmuskels durchzuführen.

1.3. Ansätze und Applikationen in der kardialen Gentherapie

1.3.1. Vektoren zum kardialen Gentransfer

Anhand des Beispiels der dilatativen Kardiomyopathie (DCM), welche zu 20 – 35% durch Mutationen verursacht werden (Maron *et al.*, 2006), wird deutlich, dass konventionelle Therapien hier an ihre Grenzen stoßen. Da in der Regel nur die Symptome einer genetisch bedingten Erkrankung behandelt, nicht aber die Ursache behoben werden kann, sind gentherapeutische Ansätze zur Korrektur von Mutationen vielversprechend. So wurden bis Januar 2007 international 1238 klinische Gentherapiestudien mit einer großen Bandbreite an nicht viralen und viralen Vektoren registriert (Lyon *et al.*, 2008). Die nicht viralen Plasmid – DNA – Vektoren sind aufgrund ihrer niedrigen Produktionskosten, unbegrenzter Transgengröße, niedriger Toxizität und Immunogenität bereits in Studien an Patienten mit Myokardischämie eingesetzt worden (Losordo *et al.*, 1998; Losordo *et al.*, 2002; Kastrup *et al.*, 2005). All diesen Studien war jedoch gemein, dass die erhofften Verbesserungen in der Angiogenese und Perfusion des Herzens ausblieben. Grund dafür ist die niedrige Effizienz der Plasmid – DNA, welche von Myozyten schlecht aufgenommen wird (Lyon *et al.*, 2008). Daher wurden einige Ansätze zur Erhöhung des DNA – Transfers in Muskelzellen verfolgt, wie die Bindung der DNA an Liposome (Miyagawa *et al.*, 2002; Rutanen *et al.*, 2004) oder Ultraschall vermittelter DNA – Transfer (Bekeredjian *et al.*, 2003; Kondo *et al.*, 2004). Allerdings zeigten virale Vektoren, wie Adenoviren (Ad) und Adeno-assoziierte Viren (AAV), im direkten Vergleich eine um das vielfache gesteigerte Gentransfereffizienz im Herzmuskel (Wright *et al.*, 2001). Grundlage dafür ist der den viralen Vektoren inhärente Tropismus und Transduktionsmechanismus, welcher durch das Kapsid und dessen vermittelter Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren des Zielgewebes und anschließender Freisetzung des Genoms nach Internalisierung des Vektors gesteuert wird (Greber *et al.*, 1993; Summerford and Samulski, 1998; Roelvink *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2005; Akache *et al.*, 2006; Zincarelli *et al.*, 2008). Die Adenoviren, welche als erste Gentransfervektoren zur myokardialen Gentherapie eingesetzt wurden (Guzman *et al.*, 1993; French *et al.*, 1994), haben neben einem geringen Risiko der insertionellen Mutagenese den Vorteil, dass sie aufgrund ihrer viralen Struktur in der Lage sind, relativ große Transgene aufzunehmen (Volpers and Kochanek, 2004). Zwar ermöglichen Adenoviren durch ihre gute

Transduktionseffizienz für das Myokard einen guten Gentransfer, welcher jedoch aufgrund der hohen Immunogenität ihrer Kapsidproteine zu einer immuninduzierten Myokarditis führt (Calabrese and Thiene, 2003). Dagegen sind die apathogenen adenoassoziierten Viren (AAV) (Kap. 1.4.1.) durch den im Vergleich zu anderen Vektorsystemen erhöhten myokardialen Tropismus und der reduzierten Immunantwort bestens für eine Gentherapie geeignet (Pacak *et al.*, 2006; Palomeque *et al.*, 2007). Grundlage des erhöhten kardialen Tropismus ist vor allem die Möglichkeit der AAV nach intravaskulärer Applikation die endotheliale Barriere mittels Transzytose zu umgehen und somit eine effiziente Transduktion der Kardiomyozyten zu ermöglichen (Di Pasquale and Chiorini, 2006). Ebenfalls positiv zu bewerten ist zum einen die niedrige Integrationsfrequenz von rekombinanten AAV in das Wirtsgenom und zum anderen die geringe Immunogenität der viralen Kapsidproteine (Chu *et al.*, 2003; Vassalli *et al.*, 2003; McCarty *et al.*, 2004; Schnepf *et al.*, 2005). Deshalb gelten AAV – basierte Vektoren, trotz der geringen Genomgröße und der sich davon ableitenden limitierten Verpackungskapazität der Vektoren für Transgene (ca. 4,7 kb) (Srivastava *et al.*, 1983; Cassinotti *et al.*, 1988; Ruffing *et al.*, 1992), als vielversprechendste Vektoren zur kardialen Gentherapie.

1.3.2. Applikationsverfahren im kardiovaskulären Gentransfer

Aufgrund einer vorangegangenen AAV – Infektion bei 30 – 70% der Bevölkerung entstehen neutralisierende Antikörper, welche auch zur Eliminierung des Gentherapievektors führen können (Blacklow *et al.*, 1968; Blacklow *et al.*, 1971; Erles *et al.*, 1999; Manno *et al.*, 2003). Daher wird die Notwendigkeit einer organspezifischen und Dosis - reduzierenden Applikationsform zum Gentransfer deutlich. Die im Folgenden beschriebenen Verfahren können je nach Beeinträchtigung des Organismus durch die Applikation in zwei Kategorien unterteilt werden (kategorisiert nach (Müller *et al.*, 2008a)). Primär können Applikation, welche einen operativen oder Katheter basierten Eingriff benötigen als invasive Ansätze bezeichnet werden (Tab. 1.2). Während erste klinische Studien eine direkte intramyokardiale Injektion (Tab. 1.2) aufgrund von potentiellen Komplikationen nach Thoraxeröffnung als kaum geeignet erschienen (Losordo *et al.*, 1998; Reilly *et al.*, 2005), konnten auf Injektionskatheter basierende klinische Studien (Tab. 1.2) bei chronischer Myokardischämie (Arteriosklerose bedingte Minderversorgung des Herzens) positive Ergebnisse erzielen, auch wenn diese nicht signifikant waren

(Rutanen *et al.*, 2004; Kastrup *et al.*, 2005). Um im Gegensatz zu den punktuellen intramyokardialen Applikationen eine homogenere Verteilung der Vektoren im Myokard zu erreichen, wurden Systeme entwickelt, welche die Applikation über das Koronarsystem des Herzens nutzen. Die dazu durchgeführten klinischen Studien, welche eine Katheter basierte Applikation verwendeten, führten aufgrund der geringen Transduktionseffizienz nicht zu dem gewünschten Ergebnis und wurden zum Teil vorzeitig abgebrochen (Lai *et al.*, 2000; Hedman *et al.*, 2003; Henry *et al.*, 2007). Die koronarvenöse Retroinfusion hingegen ermöglicht bereits im Großtierversuch (Schwein, Tab. 1.2) einen spezifischen und effizienten Gentransfer (Boekstegers *et al.*, 2000; P. Raake *et al.*, 2004; P. W. Raake *et al.*, 2008). Des Weiteren führt diese Art der Applikation in Kombination mit Kapillarpermeabilität steigernden Substanzen (Histamin, Serotonin), deren Anwendung in systemischen Applikationen per se zur Verbesserung der Transduktionseffizienz führt, zu einer Erhöhung der Transduktionseffizienz (Donahue *et al.*, 1998; Logeart *et al.*, 2001). Applikationsmethoden, welche dagegen keine operativen oder Katheter basierten Eingriffe benötigen zählen zu den nichtinvasiven Applikationen. Dabei erreicht besonders die systemische Applikation adenoassoziierter Vektoren einen effizienten transmuralen Gentransfer im Herzen (Gregorevic *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Inagaki *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2006; Pacak *et al.*, 2006).

Zur weiteren Steigerung der Effizienz und Spezifität des Gentransfers bietet sich die Ultraschall gestützte lokale Zerstörung von Mikrosphären an, welche eine organspezifische Transduktion ermöglicht (Bekeredjian *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2008b).

Applikationssysteme zum kardialen Gentransfer im Tiermodell

Applikationsform	Verwendete Vektoren	Spezies	Referenzen
Invasive Ansätze			
<i>Direkte Intramyokardialinjektion</i>	Plasmid – DNA	Schwein	(French <i>et al.</i> , 1994)
	Adenovirus	Schwein	(French <i>et al.</i> , 1994)
	AAV-1 bis -5	Maus	(Du <i>et al.</i> , 2004)
	AAV-1 bis -8	Ratte	(Palomeque <i>et al.</i> , 2007)
<i>Intramyokardialinjektion mit Injektionskatheter</i>	Adenovirus	Schwein	(Rutanen <i>et al.</i> , 2004)
<i>Koronarvenöse Retroinfusion</i>	Adenovirus	Schwein	(Boekstegers <i>et al.</i> , 2000)
	AAV-2 (R585E;R484E)	Schwein	(P. W. Raake <i>et al.</i> , 2008)

Nicht Invasive Ansätze

<i>Systemische Applikation</i>	AAV-2 (R585E;R484E)	Maus	(Müller <i>et al.</i> , 2006)
	AAV-6	Maus	(Gregorevic <i>et al.</i> , 2004)
	AAV-8	Maus	(Nakai <i>et al.</i> , 2005; Wang <i>et al.</i> , 2005)
	AAV-9	Maus	(Inagaki <i>et al.</i> , 2006; Pacak <i>et al.</i> , 2006; Vandendriessche <i>et al.</i> , 2007)
<i>Ultraschall vermittelter Transfer</i>	Plasmid – DNA	Ratte	(Bekeredjian <i>et al.</i> , 2003)
	AAV-6 und -9	Ratte	(Müller <i>et al.</i> , 2008a)

Tabelle 1.2: Übersicht über die Applikationsverfahren zum kardialen Gentransfer in Tiermodellen, modifiziert nach (Müller *et al.*, 2008a).

1.3.2.1. Ultraschall vermittelter Gentransfer

Bezüglich der Applikationsmethoden in der kardiovaskulären Gentherapie haben Untersuchungen der letzten Jahre verdeutlicht dass eine Balance zwischen Invasivität und Organspezifität gefunden werden muss (Kap. 1.3.2.). Eine Methode, die diesen Anforderungen gerecht zu werden scheint ist die Ultraschall vermittelte Zerstörung von gasgefüllten Mikrosphären (*microbubbles*= MB) (Kap. 2.2.4.4.), welche eine niedrige Invasivität mit hoher Organspezifität vereint (Mayer and Bekeredjian, 2008). Ursprünglich für den Gebrauch als Kontrastmittel zur kardialen Ultraschalluntersuchung entwickelt und etabliert, wurden die MB durch die geringen Nebeneffekte als mögliche Träger Gentherapeutischer Substanzen zur Verbesserung der Spezifität und Effizienz von Gentransferansätzen entdeckt (Von Bibra *et al.*, 1999; Leong-Poi *et al.*, 2001). Grundvoraussetzung für einen MB gestützten Gentransfer ist die Bindung der therapeutischen Substanzen an die Oberfläche der MB, was über elektrostatische oder nicht – kovalente Wechselwirkungen zwischen Agenz/Therapeutikum und MB erreicht wird (Huber and Pfisterer, 2000; Seemann *et al.*, 2002; Bekeredjian *et al.*, 2005). Die Bindung von negativ geladener Plasmid - DNA oder Adeno-assoziierten Viren (AAV) an kationische Phospholipide wurde für einen kardialen Gentransfer ausgenutzt (Bekeredjian *et al.*, 2003; Korpanty *et al.*, 2005). Dabei basiert der eigentliche Transfer auf der Ultraschall vermittelten Zerstörung der mit DNA oder Viren beladenen MB, welche durch den Puls des Schalls im Kapillarsystem des Herzens in Form von Mikroexplosionen zum Platzen gebracht werden (Postema *et al.*, 2004). Aufgrund der entstehenden „Druckwellen“ kommt es zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität, welche letztendlich zu einem

vermehrten Gentransfer ins Myokard führt (Bekeredjian *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Postema *et al.*, 2004). Verglichen mit den bereits beschriebenen invasiven Applikationsansätzen (Kap. 1.3.2.) und der Tatsache, dass eine Kontrastmittelechokardiographie als gängiges und gut verträgliches diagnostisches Mittel in der Kardiologie eingesetzt wird, ist die Ultraschall gesteuerte MB – Zerstörung eine vielversprechende Methode zum Vektortransfer bei gentherapeutischen Ansätzen.

1.4. Adeno-assoziierten Viren (AAV) als Gentherapievektoren

1.4.1. Adeno-assoziierte Viren

Erstmals Erwähnung fanden die, mit einer Größe von ca. 22 nm zu den kleinsten Viren zählenden, ikosaedrischen Adeno-assoziierten Viren (AAV) in einer Publikation von 1965, in der sie als Kontamination in adenoviralen Produktionen beschrieben wurden (Kilham and Olivier, 1959; Atchison *et al.*, 1965; Hoggan *et al.*, 1966). Aufgrund der helfervirusabhängigen Replikation der AAV erfolgte die Klassifikation in einem separaten Genus, dem des *Dependovirus* (Siegl *et al.*, 1985). Als Vertreter der Familie *Parvoviridae* besitzen die AAV analog zu den anderen Parvoviren ein einzelsträngiges DNA – Genom mit einer Länge von ca. 4,7 kb (Cassinotti *et al.*, 1988; Ruffing *et al.*, 1994), welches aus zwei offenen Leserahmen (open reading frame = ORF) besteht, die die viralen Proteine kodieren (Rose *et al.*, 1971; Hermonat *et al.*, 1984; Muzyczka *et al.*, 1984; Tratschin *et al.*, 1984). Flankiert wird diese kodierende Region von palindromischen Bereichen, welche als invertierte terminale Wiederholungen (inverted terminal repeat = ITR) bezeichnet werden (Lusby *et al.*, 1980; McLaughlin *et al.*, 1988; Samulski *et al.*, 1989). Strukturell fallen diese ITRs vor allem durch die Bildung einer T – ähnlichen Struktur auf, welche durch Basenpaarungen in den palindromischen Regionen der ITRs hervorgerufen werden (Lusby *et al.*, 1980). Aufgrund dieser Struktur dient das 3' - Ende der ITRs von AAV als Ausgangspunkt der Zweitstrangsynthese nach Infektion einer Zelle und ist somit essentiell für die Transkription und Replikation. Zusätzlich dazu spielen die ITRs bei der Stabilisation der viralen Genexpression und der Verpackung eine wichtige Rolle (Samulski *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1995, 1996; Wang *et al.*, 1997). Da die beiden ORFs sowohl die strukturgebenden Kapsidproteine (VP 1 - 3), als auch die regulatorischen, replikationsnotwendigen und Integration vermittelnden Proteine (Rep78, 68, 52 und 40) kodieren, erfolgt deren Synthese mittels translationaler

(Benutzung verschiedene Promotoren) und posttranslationaler Modifikationen (alternatives Spleißen) (Johnson *et al.*, 1971; Rose *et al.*, 1971; Laughlin *et al.*, 1979; Mendelson *et al.*, 1986; Trempe *et al.*, 1987; Becerra *et al.*, 1988). Der Replikationszyklus der AAV beginnt in der Regel mit der Bindung des Virus an einen primären Rezeptor (z.B. Heparansulfat - Proteoglykan bei AAV2) (Summerford and Samulski, 1998; Akache *et al.*, 2006). Durch die Unterstützung eines Sekundärrezeptors erfolgt die Internalisierung des Virus in die Wirtszelle (Summerford *et al.*, 1999; Bartlett *et al.*, 2000; Sanlioglu *et al.*, 2000). Der anschließende Transport der Viren durch das Zytoplasma bis zum Nukleus erfolgt vermutlich entlang der Mikrotubuli (Seisenberger *et al.*, 2001). Aufgrund von Hinweisen, nach denen das intakte Virus den Zellkern erreicht, kann geschlossen werden, dass die Freisetzung des Genoms im Nukleus stattfindet (Bartlett *et al.*, 2000; Sanlioglu *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2001; Seisenberger *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2002). Nach Freisetzung des Genoms sind die AAV in der Lage in Abwesenheit eines Helfervirus eine latente Infektion zu etablieren. Diese wird bei Wildtypviren bevorzugt durch eine Integration der Virus – DNA ins Wirtsgenom erreicht (Berns *et al.*, 1975; Cheung *et al.*, 1980; Laughlin *et al.*, 1986). Rekombinante AAV – Vektoren hingegen liegen in der Regel in episomaler Form im Kern vor (McCarty *et al.*, 2004). Der Übertritt in den produktiven Replikationszyklus erfolgt nach Koinfektion der Wirtszelle mit Helferviren, wie den Adenoviren oder den Herpesviren (Buller *et al.*, 1981).

1.4.2. Adeno-assoziierte Viren in der Gentherapie

Die Möglichkeit, über gentherapeutische Ansätze zelluläre Defekte kausal zu korrigieren, führte zu einem erhöhten wissenschaftlichen Interesse an Adeno-assoziierten Viren (AAV). Grund dafür ist vor allem die apathogene Infektion und die Abhängigkeit der AAV von Helferviren für eine produktive Replikation (Buller *et al.*, 1981; Monahan and Samulski, 2000). Die niedrige Integrationsfrequenz ins Wirtsgenom und die geringe Immunogenität der viralen Kapsidproteine eröffnen einen langanhaltenden Gentransfer (Chu *et al.*, 2003; Vassalli *et al.*, 2003; McCarty *et al.*, 2004; Schnepf *et al.*, 2005). Auch wenn der breite Tropismus der AAV (Kap. 1.4.2.1.) und die geringe Verpackungskapazität der Vektoren (Kap. 1.3.1.) sich nachteilig auf das Vektorsystem auswirken, so überwiegen doch die eben

beschriebenen Vorteile, weshalb die AAV bereits in klinischen Studien zum Einsatz kamen (Odom *et al.*, 2007).

1.4.2.1. Transduktionelle Regulation Adeno-assoziiierter viraler Vektoren

Voraussetzung einer jeden Gentherapie ist die Spezifität des Gentherapeutikums bezüglich des Zielgewebes. Dadurch dass die verschiedenen Serotypen von AAV *in vivo* über unterschiedliche Tropismen verfügen kann man, durch Wahl des entsprechenden Serotyps, die Spezifität für bestimmte Gewebe oder Organe erhöhen. In entsprechenden Studien (Atchison *et al.*, 1965; Melnick *et al.*, 1965; Hoggan *et al.*, 1966; G. P. Gao *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2004) wurden die bisher bekannten 12 AAV-Serotypen bezüglich ihres Tropismus untersucht. Auch wenn die Resultate dieser Studien, aufgrund von unterschiedlich gewählten Parametern (Dosis, Promotor, Transgen, Spezies) voneinander abweichen, so ist es doch möglich eine generelle Aussage für einige Serotypen zu treffen (Wu *et al.*, 2006). Primär wäre AAV2 zu nennen, dessen Bindung an Heparansulfat - Proteoglykan auf eine bevorzugte Lebertransduktion hindeutet (Kern *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2006). Jedoch zeigen besonders Studien an Mäusen eher einen unspezifischen Tropismus (Inagaki *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2006; Vandendriessche *et al.*, 2007; Zincarelli *et al.*, 2008).

Um die Spezifität von AAV – Vektoren zu erhöhen, ist es möglich, durch Verpacken eines auf AAV2 basierenden Vektorgenomes in andere AAV – Serotypkapside den Tropismus zu verändern (G. P. Gao *et al.*, 2002; Rabinowitz *et al.*, 2002; Grimm and Kay, 2003; Grimm *et al.*, 2003a). So konnte besonders für rekombinante AAV6, 8 und 9 ein effektiver Gentransfer in den Herzmuskel nach systemischer Vektorapplikation in Mäuse nachgewiesen werden (Gregorevic *et al.*, 2004; Inagaki *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2006; Pacak *et al.*, 2006; Zincarelli *et al.*, 2008). Zusätzlich dazu zeigen diese AAV - Vektoren einen erhöhten Tropismus hinsichtlich des Skelettmuskels (G. P. Gao *et al.*, 2002; Rabinowitz *et al.*, 2002; Grimm *et al.*, 2003b; Blankinship *et al.*, 2004; Zincarelli *et al.*, 2008).

Eine weitere Möglichkeit, den Tropismus zugunsten eines bestimmten Organs zu verändern, ist die Modifikation des Kapsides. So können Insertionen kurzer Peptidmotive an bestimmten Positionen des Kapsides und die anschließende Selektion der veränderten Viren zu einem zielgerichteten Tropismus führen (Büning *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2003; Perabo *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte bei AAV2

durch Veränderungen in der Aminosäuresequenz des Kapsids die Bindung an den primären Rezeptor (Heparansulfat – Proteoglykan) verhindert werden. Daraus resultierte eine Reduktion der Lebertransduktionseffizienz bei gleichzeitiger Steigerung der Transduktionsrate des Herzens (Müller *et al.*, 2006). Dies wiederum verdeutlicht das Potential der Kapsidmodifikationen von AAV und eröffnet neue Möglichkeiten im Bereich des gewebespezifischen Gentransfers.

1.4.2.2. Regulation der Transgenexpression im Herzmuskel

Neben der Spezifitätserhöhung des Gentransfers mit Adeno-assoziierten Viren (AAV) durch einen verbesserten Tropismus ist auch eine effiziente und spezifische Expression des Transgens notwendig. Die Verwendung eines gängigen Promotors wie der des Cytomegalovirus – Promotors (CMV) führt zu einer sehr unspezifischen - und eventuell abgeschwächten Expression im gewünschten Zielgewebe (Qin *et al.*, 1997; Brooks *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2004; Inagaki *et al.*, 2006; Pacak *et al.*, 2006; Palomeque *et al.*, 2007). Handelt es sich dabei um das Herz, bietet sich die Verwendung herzmuskelspezifischer Promotoren an (Tab. 1.3). Diese ermöglichen einerseits einen weitgehend auf den Herzmuskel beschränkten Gentransfer, unterliegen andererseits aber der gewebespezifischen Transkriptionskontrolle. Um eine effektive Transgenexpression bei hoher Gewebespezifität zu erreichen, werden heterologe Promotoren verwendet, welche sich aus viralen und eukaryotischen Komponenten zusammensetzen (Tab. 1.3). Studien, welche den CMV verstärkten β -Aktin – Promotor verwendeten (Tab. 1.3), erreichten zwar einen effizienten kardialen Gentransfer, mussten jedoch eine erhöhte Expressionen des Transgens in anderen Geweben verzeichnen (Kawamoto *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Vielversprechender ist der CMV verstärkte Myosin – Leichtketten - 2v – Promotor (MLC), welcher wie in mehreren Studien gezeigt, über eine hohe Spezifität bei guter Transgenexpression verfügt (Müller *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2008b).

Promotoren zum kardialen Gentransfer im Tiermodell		
Promotor	Spezies	Referenz
Homologe Promotoren:		
<i>Kardialer Troponin – T Promotor</i>	Maus	(Pacak <i>et al.</i> , 2008)
<i>Desmin – Promotor</i>	Maus	(Pacak <i>et al.</i> , 2008)
<i>Myosin Schwerketten - Promotor</i>	Maus	(Pacak <i>et al.</i> , 2008)
<i>Myosin Leichtketten – 2v Promotor</i>	Ratte	(Griscelli <i>et al.</i> , 1998; Phillips <i>et al.</i> , 2002)
<i>Muskelkreatinkinase Promotor</i>	Maus	(Sun <i>et al.</i> , 2005)
Heterologe Promotoren:		
<i>CMV verstärkter β-Aktin Promotor</i>	Ratte	(Kawamoto <i>et al.</i> , 2005)
<i>CMV verstärkter Myosin Leichtketten – 2v Promotor</i>	Maus, Ratte	(Müller <i>et al.</i> , 2006; Müller <i>et al.</i> , 2008b)

Tabelle 1.3: Übersicht über die Promotoren zum kardialen Gentransfer in Tiermodellen, modifiziert nach (Müller *et al.*, 2008a).

1.5. Zielstellung der Arbeit

Das Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es zum einen, einen Gentransferansatz mit Adeno-assoziierten Viren (AAV) zu entwickeln, welcher die spezifische Behandlung einer genetisch bedingten Kardiomyopathie im Tiermodell ermöglicht. Dazu sollte die Optimierung eines herzmuskelspezifischen Gentransfers von AAV – Vektoren sowohl auf transduktioneller (durch Kombination verschiedener Serotypen), als auch auf transkriptioneller (durch Verwendung unterschiedlicher Promotoren) Ebene erfolgen. In einem zweiten Teil dieser Arbeit sollte eine Erhöhung der kardialen Transduktionseffizienz der AAV speziell für größere Organismen bei niedriger Vektordosis erzielt werden. Dazu sollte die Effizienz einer nicht invasiven kardialen Applikationsmethode eruiert werden, welche auf der Ultraschall - vermittelten Zerstörung AAV - beladener Mikrosphären basiert.

Abschließend sollte ein Gentransfer einer verkürzten Dystrophin - cDNA mittels transkriptionell und transduktionell zielgerichteten AAV in ein Dystrophin defizientes Mausmodell (Mdx) erfolgen. Dies soll als Modellsystem dienen um die Therapie einer genetisch bedingten Kardiomyopathie beim Menschen zu ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien des höchsten Reinheitsgrades (*pro analysis*) der folgenden Firmen verwendet:

Carl-Roth	Karlsruhe
Roche	Mannheim
Invitrogen	Karlsruhe
Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
New England Biolabs	Ipswich, MA, USA
Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA
BD Bioscience	Franklin Lakes, NJ, USA
Merck	Darmstadt
JT Baker	Phillipsburg, NJ, USA
VWR	Darmstadt
AppliChem GmbH	Darmstadt
SERVA GmbH	Heidelberg

2.1.1.1. Allgemeine Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Agar	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Bacto-Hefeextrakt	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Bacto Trypton	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DTT (Dithiotreitol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA (Ethylendinitroltetraessigsäure)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethidiumbromid	Carl-Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37%)	JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Formamid (95%)	VWR, Darmstadt
Glycerin	Carl-Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd (25%)	SERVA GmbH, Heidelberg
HCl (Salzsäure) (1N)	VWR, Darmstadt
H ₃ PO ₄ (Phosphorsäure)	AppliChem GmbH, Darmstadt
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid)	Carl-Roth, Karlsruhe

Isopropanol	<i>AppliChem GmbH</i> , Darmstadt
KCl (Kaliumchlorid)	<i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, MO, USA
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	<i>Merck</i> , Darmstadt
Methanol	<i>JT Baker</i> , Phillipsburg, NJ, USA
Na-Ac (Natriumacetat)	<i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, MO, USA
NaCl (Natriumchlorid)	<i>AppliChem GmbH</i> , Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ (Natriumhydrogenphosphat)	<i>AppliChem GmbH</i> , Darmstadt
NaOH (Natriumhydroxid)	<i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, MO, USA
NH ₄ -Ac (Ammoniumacetat)	<i>Merck</i> , Darmstadt
NP40 (Nonidet P40)	<i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, MO, USA
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	<i>Carl-Roth</i> , Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	<i>SERVA GmbH</i> , Heidelberg
Taurin	<i>Merck</i> , Darmstadt
TBE (Tris-Borat-EDTA) (10 x)	<i>Carl-Roth</i> , Karlsruhe
Tris (hydroxymethyl-aminomethan)	<i>Carl-Roth</i> , Karlsruhe
Triton X-100 (Octoxinol-9)	<i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, MO, USA
Trizol	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
Tween 20	<i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, MO, USA
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β-D-galactopyranosid)	<i>Carl-Roth</i> , Karlsruhe
Xylol	<i>Carl-Roth</i> , Karlsruhe

2.1.1.2. Spezielle Chemikalien

Ampicillin-Natriumsalz	<i>Carl-Roth</i> , Karlsruhe
Benzonase Nuclease	<i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, MO, USA
DL-α-phosphatidylcholin	<i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, MO, USA
DL-α-phosphatidylethanolamin	<i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, MO, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	<i>SERVA GmbH</i> , Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	<i>Biochrom AG</i> , Berlin
Kanamycinsulfat	<i>Carl-Roth</i> , Karlsruhe
Kristallviolett	<i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, MO, USA
L-Glutamin (200mM)	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
NuPage Running Buffer	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
NuPage Sample Buffer	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
NuPage Reducing Agent	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
NuPage Antioxidant	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
Optimem	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
OptiPrep (Iodixanol)	<i>Axis-Shield</i> , Oslo, Norwegen
Paraplast	<i>Leica Microsystems GmbH</i> , Wetzlar

PEI (Polyethylenimin)	<i>Polysciences</i> , Warrington, PA, USA
Penicillin/Streptomycin-Mix (10.000 U/ml:10mg/ml)	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
Proteaseinhibitorencocktail complete	<i>Roche</i> , Mannheim
Reporter lysis buffer	<i>Promega</i> , Madison, WI, USA
RNAse Exitus Plus	<i>AppliChem</i> , Darmstadt
Roti-Block (10x)	<i>Carl-Roth</i> , Karlsruhe
Roti-Histokitt	<i>Carl-Roth</i> , Karlsruhe
Spectinomycin-dihydrochlorid-pentahydrat	<i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, MO, USA
Trypsin 0,05% - EDTA	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
2,2,2 – Tribromethanol	<i>Sigma-Aldrich</i> , St. Louis, MO, USA

2.1.1.3. Komplettsysteme

Fast Plasmid Mini Kit	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
Plasmid Kit (Maxi, Giga)	<i>Qiagen</i> , Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	<i>Qiagen</i> , Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i> , Hilden
DNeasy Blood & Tissue Kit	<i>Qiagen</i> , Hilden
Genomic DNA-Isolation Tissue	<i>Nexttec GmbH</i> , Leverkusen
Quick Change Mutagenesis Kit	<i>Stratagene</i> , La Jolla, CA, USA
SuperScript III Firststrand cDNA Synthesis Kit	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
T4 DNA Ligation Kit	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, MA, USA
Luciferase Assay System	<i>Promega</i> , Madison, WI, USA
NanoOrange Protein Quantitation Kit	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
DC Protein Assay	<i>Bio-Rad</i> , Hercules, CA, USA
RNAqueous-4PCR Kit	<i>Applied Biosystems</i> , Foster City, CA, USA

2.1.1.4. spezielle Materialien

Einbettmoulds	<i>Leica Microsystems GmbH</i> , Wetzlar
Hämatokrit Kapillaren	<i>Hirschmann Laborgeräte</i> , Eberstadt
Heparin Microtainer Tubes	<i>BD Bioscience</i> , Franklin Lakes, NJ, USA
ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen	<i>Vector Laboratories</i> , Burlingame, CA, USA
Polystyrene CellSTACK 10 chamber	<i>Corning</i> , Lowell, MA, USA
Polystyrene CellSTACK 5 chamber	<i>Corning</i> , Lowell, MA, USA
Quick-Seal Tubes (10x76mm)	<i>Beckman-Coulter</i> , FL, USA
Quick-Seal Tubes (25x89mm)	<i>Beckman-Coulter</i> , FL, USA
Super Frost Plus Objektträger	<i>Paul Marienfeld GmbH</i> , Lauda-Königshofen

Tissue Tek

Leica Microsystems GmbH,
Wetzlar

Zentrifugenbecher konisch 250ml

Corning, Lowell, MA, USA

2.1.2. Standardlösungen

Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in Reinstwasser (*PureLab*, Siemens, München) angesetzt und anschließend durch Filtration oder im Autoklaven für 20min bei 121°C sterilisiert.

2.1.2.1. Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

6x DNA – Gel – Probenpuffer	Ficoll 400	15% (w/v)
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanol FF	0,25% (w/v)
6x Kristallviolet – Probenpuffer	Glycerol	30% (v/v)
	EDTA	2 mM
	Kristallviolet	100 µg/ml
	in sterilem H ₂ O ansetzen	
Kristallviolet-Gelfärbelösung	Kristallviolet	2 mg/ml
	in sterilem H ₂ O ansetzen	
1x TE	Tris/HCl	5 mM
	EDTA	0,1 mM
	auf pH 7,4 einstellen	
1x PBS	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
	KH ₂ PO ₄	1,47 mM
	auf pH 7,4 einstellen	
50x TAE	Tris	2 M
	EDTA	50 mM
	Eisessig	60 mM
10x TBE	Tris	2 M
	Borsäure	1,6% (v/v)
	EDTA	10 mM

2.1.2.2. Nährmedien und Lösungen für Bakterienkulturen

Ampicillinlösung	Ampicillin-Natrium-Salz in H ₂ O, sterilfiltriert	100 mg/ml
Kanamycinlösung	Kanamycinsulfat in H ₂ O, sterilfiltriert	25 mg/ml

Spectinomycinlösung	Spectinomycinsalz in H ₂ O, sterilfiltriert	25 mg/ml
LB – Agar	Bacto – Trypton Bacto – Hefeextrakt NaCl Agar in H ₂ O lösen, autoklavieren	10 g 5 g 5 g 16 g
LB – Medium	Bacto – Trypton Bacto – Hefeextrakt NaCl in H ₂ O lösen, autoklavieren	10 g 5 g 5 g
2xYT – Medium	Bacto – Trypton Bacto – Hefeextrakt NaCl in H ₂ O lösen, autoklavieren	16 g 10 g 5 g

2.1.2.3. Nährmedien und Lösungen für Zellkulturen

DMEM (+++)	Fötales Kälberserum L – Glutamin (200mM) Penicillin (10.000U/ml) Streptomycin (10mg/ml) unter Sterilbank mit DMEM vermischen	10% (v/v) 1% (v/v) 0,5% (v/v) 0,5% (v/v)
DMEM (++ø)	Fötales Kälberserum L – Glutamin (200mM) unter Sterilbank mit DMEM vermischen	10% (v/v) 1% (v/v)
Kryokonservierungsmedium	Fötales Kälberserum DMSO unter Sterilbank mit DMEM vermischen	900 µl 100 µl

2.1.2.4. Virusproduktion

PBS-MK	MgCl ₂ KCl in PBS lösen, sterilfiltrieren	1mM (w/v) 2,5mM (w/v)
PBS-MKN	NaCl in PBS-MK lösen, sterilfiltrieren	1M (w/v)
Lysepuffer	Tris-Cl NaCl in Braun H ₂ O lösen, auf pH8,5 einstellen, sterilfiltrieren	50mM (w/v) 150mM (w/v)
PEI (Polyethylenimmin)	PEI H ₂ O (Braun) sterilfiltrieren, bei -80°C einfrieren	0,323 g ad 1 L

Phenolrot

Phenolrot 0,5% (w/v)
In Braun H₂O lösen, steriltrieren

Iodixanol Lösungen:

Endvolumen [ml]	Iodixanol-Lösung [%]	60% Iodixanol [ml]	PBS-MK [ml]	PBS-MKN [ml]	Phenolrot-Lösung
100	60	100	-	-	Gelbfärbung
100	40	66,6	34,4	-	-
100	25	41,6	58,4	-	Rotfärbung
100	15	25	-	75	-

2.1.2.5. Proteinbiochemie

Längenstandard für Proteingele

HiMark PreStained
Broad Range Prestained

Invitrogen, Karlsruhe
New England BioLabs, Ipswich
MA, USA

Primärantikörper

Dystrophin. (C-Terminus)
 α -Actinin
 β -Tubulin

Abcam, Cambridge, MA, USA
Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,
USA
Dianova, Hamburg

Sekundärantikörper

Goat anti mouse IRDye 800
Goat anti rabbit IRDye 680

LI-COR, Lincoln, NB, USA
LI-COR, Lincoln, NB, USA

Proteinextraktion

RIPA	Tris (1M, pH7,5)	500 μ l
	EDTA (0,5 M)	1,5 ml
	NP40 (100%)	500 μ l
	Na-Deoxycholat	0,25 g
	SDS (10%)	500 μ l
	H ₂ O	ad 50 ml
	Proteaseinhibitor (25x)	2 ml
	DTT	50 μ l

Polyacrylamid – Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blot

1x NuPage Running Buffer	20x NuPage Buffer	50 ml
	H ₂ O	950 ml
1x NuPage Running Buffer reduziert	1x NuPage Buffer	200 ml

	NuPage Antioxidant	500 µl
Transferpuffer	Tris	1,8 g
	Taurin	1,9 g
	H ₂ O	ad 1 L
Blockingpuffer	10x Rothi-Block	10 ml
	H ₂ O	90 ml
PBST	PBS (1x)	1 L
	Tween 20	0,1% (v/v)

2.1.2.6. Histologische Reagenzien

Primärantikörper

NCL-Dys2 (Dystrophin - C – Terminus)	<i>Novo Castra (Leica), Wetzlar</i>
β-Aktin	<i>Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA</i>
Biotinylierter CD8α (Ly2)	<i>BD Bioscience, San Jose, CA, USA</i>
Biotinylierter CD4	<i>BD Bioscience, San Jose, CA, USA</i>
Cy3-conjugated F(ab) ₂ anti mouse IgG	<i>Leinco Technologies, St. Louis, MO, USA</i>
Biotin-conjugated CD11b/Mac-1	<i>Southern Biotech, Birmingham, AL, USA</i>
Alexa Fluor 546-Phalloidin	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
A20 (anti AAV2)	<i>AG Kleinschmidt, DKFZ, Heidelberg</i>

Sekundärantikörper

Biotinyliertes Anti-Maus IgG	<i>Vector Laboratories, Burlingham, CA, USA</i>
Biotinyliertes Anti-Kaninchen IgG Reagenz	<i>Vector Laboratories, Burlingham, CA, USA</i>
Cy3 gekoppelter rabbit anti Mouse	<i>Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA</i>

Immunhistologische Seren

Normales Kaninchenserum	<i>Vector Laboratories, Burlingham, CA, USA</i>
-------------------------	---

Immunhistologische Lösungen

BSA-Lösung	Bovines Serumalbumin in PBS lösen	0,1% (w/v)
BSA-Blocklösung	Bovines Serumalbumin	5% (w/v)

in PBS lösen

Immunhistologische Komplettsysteme

M.O.M Immunodetection Kit	<i>Vector Laboratories,</i> Burlingham, CA, USA
Streptavidin/Biotin Blocking Kit	<i>Vector Laboratories,</i> Burlingham, CA, USA
Streptavidin:FITC	<i>Vector Laboratories,</i> Burlingham, CA, USA
Hard+Set Mounting medium with DAPI	<i>Vector Laboratories,</i> Burlingham, CA, USA
Vectastain ABC Kit	<i>Vector Laboratories,</i> Burlingham, CA, USA
DAB Substrate Kit for Peroxidase	<i>Vector Laboratories,</i> Burlingham, CA, USA

Histologische Lösungen

Kryoprotektionsmedium	Sucrose	20% (w/v)
	in PBS lösen, sterilfiltrieren	
	Formaldehyd (37%)	1,5% (v/v)
	Glutaraldehyd (25%)	0,1% (v/v)
Fixierlösung	Formaldehyd (37%)	4% (v/v)
	in sterilem PBS	
Ethanol – Reihe	Ethanol (99,9%)	96% (v/v)
		bis
	Ethanol (99,9%)	30% (v/v)
	mit H ₂ O verdünnen	

Histologische Komplettsysteme

Hämatoxylin (Mayer)	<i>Sigma-Aldrich,</i> St. Louis, MO, USA
Eosin aqueous	<i>Thermo Fisher,</i> Waltham, MA, USA
Elastic Stain Kit	<i>Sigma-Aldrich,</i> St. Louis, MO, USA

2.1.3. Nukleinsäuren

2.1.3.1. Plasmide

Klonierungsvektoren	Resistenz	Herkunft
pCR8/GW/TOPO	Spectinomycin	Invitrogen, Karlsruhe
pUF-CMV _{enh} -MLC0.26kb-Luc	Ampicilin	O.J. Müller, Heidelberg

pTR-UF5-CMV-GFP	Ampicilin/Neomycin	(Veldwijk <i>et al.</i> , 2002)
pdsAAV-CMV-EGFP	Ampicilin	(Wang <i>et al.</i> , 2003)
pRC-CMV-125c-μDystrophin	Ampicillin	(Jorgensen <i>et al.</i> , 2009)
pTR-UF5-CMV _{enh} -MLC0.26kb-μDys-lackUTR	Ampicillin/Neomycin	In dieser Arbeit erstellt

Reportergenvektoren	Resistenz	Herkunft
pUF-CMV _{enh} -MLC1.5kb-Luc	Ampicilin	(Müller <i>et al.</i> , 2006)
pUF-CMV _{enh} -MLC0.26kb-Luc	Ampicilin	O.J.Müller, Heidelberg
pdsAAV-CMV-EGFP	Ampicilin	(Wang <i>et al.</i> , 2003)
dsAAV-CMV _{enh} -MLC0.26kb-EGFP	Ampicilin	in dieser Arbeit erstellt, (Müller <i>et al.</i> , 2008b)

Transgenvektoren	Resistenz	Herkunft
pUF-CMV _{enh} -MLC0.26kb-μDys	Ampicilin	in dieser Arbeit erstellt
pTR-UF5-CMV-μDys_lackUTR/Neo	Ampicilin	in dieser Arbeit erstellt
pTR-UF5-CMV _{enh} -MLC0.26kb-μDys_lackUTR/Neo	Ampicilin	in dieser Arbeit erstellt

Produktionsplasmide	Resistenz	Herkunft
pDGΔVP	Ampicilin	(Dubielzig <i>et al.</i> , 1999)
p5E18-VD2/9	Ampicilin	(G. Gao <i>et al.</i> , 2004)
pDP2	Ampicilin	(Grimm <i>et al.</i> , 2003a)

2.1.3.2. Oligonukleotide

Alle benutzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Bei Oligonukleotid – Paaren, welche in einer Linker - PCR zum Einsatz kamen (2.2.1.10.), wurden die Restriktionsschnittstellen fett hervorgehoben. In den für Mutagenesen (2.2.1.12.) verwendeten Oligonukleotiden, sind die entsprechenden Mutationen kursiv und unterstrichen dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
Sequenzierungsprimer pdsAAV-CMV-EGFP	
#1 dsAAV-for	cag cag ctg gcg taa tag cg
#2 dsAAV-rev	ggg cga tga acg gta atc g
#3 dsAAV-for	gcg cgc tcg ctc gct cac
#4 dsAAV-rev	cgc tat cca cgc cca ttg gtg
#5 dsAAV-for	cgc ggg ccc ggg atc cac cg
#6 dsAAV-rev	gtg gtt gtc ggg cag cag c

#7 dsAAV-for	ctc cgg cct ttc tca ccc g
#8 dsAAV-rev	gcg gga gct aaa cag gag g

Amplifikation des CMV_{enh}-MLC0.26kb

#13 MluI-CMV-MLC-for	cga cgc gtc ggc ggc cgc ttc gag ctc gcc cga c
#14 CMV-MLC-HindIII-rev	ccc aag ctt ggg caa gga gcc tgc tgg ccg gcc cct gc
#80 CMV-MLC-for	tag ggg ttc cta gat ctg aat tcg gta ccg c
#81 CMV-MLC-XhoI-rev	ctc gag caa gga gcc tgc tgg ccg gcc cct gct gtg

Sequenzierungsprimer dsAAV-CMV_{enh}-MLC0.26kb-EGFP

#15 CMV-rev	cct gcc cag tgc ctc acg ac
#16 MLC-for	cgc cct gcg cgc tcg ctc gc
#23 EGFP-for	tac gtc cag gag cgc acc at
#24 EGFP-rev	tcc gcc ctt aac tag atc ct
#103 MLC-for	gta aca act ccg ccc cat gc

Sequenzierungsprimer pUF-CMV_{enh}-MLC0.26kb-Luc

#64 CMV-Luc-KON for	gta tca tat gcc aag tac gc
#65 CMV-Luc-KON for	gag ctc gcc cgg gga tcc tc
#66 CMV-Luc-KON rev	ctg tga ttt gta ttc agc cc

Sequenzierungsprimer μ Dystrophin cDNA

#9 pUF_ μ Dys-for	cgg tac cgc ggc cgc ccc c
#10 pUF_ μ Dys-rev	gtc gtt gtg tgg ctg act gct ggc
#11 pUF_ μ Dys-for	gct gct ccg agt ggt tgg cag tc
#12 pUF_ μ Dys-rev	gtc tgc tcg aag cgg ccg gcc
#37 μ Dys-1 for	ctg aat tcg gta ccg cgg tg
#38 μ Dys-2 for	tcc tat gca tcc aac gcg tt
#39 μ Dys-3 for	cct cca ctg gca ggt caa aa
#40 μ Dys-4 for	ctt cac agc att tgg aag ct
#41 μ Dys-5 for	ttg gaa gac aag tac aga tac
#42 μ Dys-6 for	atc aac ttc tgg cca gta ga
#43 μ Dys-7 for	tcc ttc tac ctc tct aca ga
#44 μ Dys-8 rev	cta agg act cca tcg ctc tg
#45 μ Dys-9 rev	gcc agt ttt aaa aga cag ga
#46 μ Dys-10 rev	cct aat tga tat ctg gcg at
#47 μ Dys-11 rev	gca tgg ggc gga gtt gtt ac
#48 μ Dys-12 for	ttc gct att acg cca gct gg
#49 μ Dys-13rev	cgt aag tta tgt aac gcg ga
#50 μ Dys-14 for	ccc aat tcg ccc cta gag tc
#51 μ Dys-15 rev	tca tta atg cag ctg ggc tg
#52 μ Dys-16 for	gga gca act caa caa ctc ctt ccc
#53 μ Dys-17 rev	ctc ttt cat aac agt cct ctac ttc
#99 μ Dys18 for	cat act cat gag ggg tac at

#100 μ Dys19 for ata tca acc acg aga ctc aa

Amplifikation der μ Dystrophin cDNA

#78 DysA-NotI-for **gcg gcc gca** tgc ttt ggt ggg aag aag tag
agg act

#79 DysA-NotI-rev **gcg gcc gca** aaa gac ttc cta cat tgt gtc
ctc tct

μ Dystrophin cDNA – Mutageneseprimer

#74 DysMut-for ccc agg cag agg cca aag tga atg gca caa c

#75 DysMut-rev gtt gtg cca ttc act ttg gcc tct gcc tgg g

Genotypisierungsprimer

#33 Mdx-geno-for ttt ctg tct aaa tat aat atg ccc tgt

#34 Mdx-geno-rev ttt ccc atc aca ttt tcc aa

2.1.3.3. DNA – Längenstandards

100 bp DNA-Marker, extended

New England BioLabs, Ipswich,
MA, USA

2-Log DNA-Marker (0,1-10,0 kb)

New England BioLabs, Ipswich,
MA, USA

λ -HindIII

New England BioLabs, Ipswich,
MA, USA

2.1.3.4. Geräte

ABI Prism7000

Applied Biosystems, Foster
City, CA, USA

Absaugpumpe Absaugpumpe

Integra Bioscience GmbH,
Fernwald

Alpha Digidoc 1000

Alpha Innotech

Binokular MZ FL III

Leica Microsystems GmbH,
Wetzlar

Blotkammer „Transblot-Mini-Cell“
Brutschrank

BioRad, Hercules, CA, USA
Heraeus Instruments GmbH,
Haunau

- Bakterieninkubator

- Hera cell 240

Capmix 3M

St. Paul, MN, USA

Cordless Tube Topper Modell

Beckman-Coulter, FL, USA

Digitaler Bilddrucker UP-D895

Sony, Tokyo, JP

Einbettstation EG 1150H

Leica Microsystems GmbH,
Wetzlar

Elektrophoresekammer Nukelinsäuren

Carl-Roth, Karlsruhe

Elektrophoresekammer Proteine

Invitrogen, Karlsruhe

Elektroporator Gene Pulser II

BioRad, Hercules, CA, USA

Fahrrad-Tachometer BC 500

Sigma Elektor GmbH, Neustadt

Feinwaage ARJ 120-4M	<i>Kern & Sohn GmbH, Balingen</i>
Fluoroskan Ascent FL	<i>Thermo Scientific,</i> Waltham, MA, USA
Gefrierschrank	<i>Liebherr, Ochsenhausen</i>
Heizblock Accu Block	<i>Neolab (Labnet International),</i> Heidelberg
Infrared Imaging System Odyssey	<i>LI-COR, Lincoln, NB, USA</i>
Kugelmühle MM301	<i>Qiagen, Hilden</i>
Kühlschrank No Frost	<i>Liebherr, Ochsenhausen</i>
Kühltisch EG 1150C	<i>Leica Microsystems GmbH,</i> Wetzlar
Kryotom CM3050S	<i>Leica Microsystems GmbH,</i> Wetzlar
Luminometer LB9501	<i>Berthold, Bad Wildbad</i>
Magnetrührer MSH basic	<i>IKA Works Inc., Wilmington,</i> NC, USA
Mikroskop Eclipse 90i	<i>Nikon, Düsseldorf</i>
- Graustufenkamera D1QM	
- Durchlichtkamera DS-Ri1	
Mikroskop Axiovert 25	<i>Carl-Zeiss, Jena</i>
Mikrotom RM2255	<i>Leica Microsystems GmbH,</i> Wetzlar
Multisizer 3	<i>Beckman-Coulter, FL, USA</i>
PH-Meter MP220	<i>Neolab (Mettler Toledo),</i> Heidelberg
Photometer	
- ND1000	<i>Nanodrop, Wilmington, USA</i>
Power Pac 300	<i>BioRad, Hercules, CA, USA</i>
Reinstwassersystem PureLab	<i>Siemens, München</i>
Rotoren	
- T1270	<i>(Sorvall) Thermo Scientific,</i> Waltham, MA, USA
- 50.2 TI	<i>(Sorvall) Thermo Scientific,</i> Waltham, MA, USA
- 6445	<i>Heraeus Instruments GmbH,</i> Haunau
Schüttelinkubator	<i>Heraeus Instruments GmbH,</i> Haunau
Sterilbank Herasafe	<i>Heraeus Instruments GmbH,</i> Haunau
Sonos 5500	<i>Philips, Eindhoven, NL</i>
Thermocycler "ep gradient S"	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Thermomixer Comfort	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Thermosealer ALPSTM50V	<i>Thermo Scientific,</i> Waltham, MA, USA
Ultraschallköpfe	<i>Philips, Eindhoven, NL</i>
- S3 Transducer	
- S12 Transducer	
Vortex IKA MS3 digital	<i>IKA Works Inc., Wilmington,</i> NC, USA
Waage 440-47	<i>Neolab (Kern), Heidelberg</i>

Wasserbad HI1210

Leica Microsystems GmbH,
Wetzlar

Zentrifugen

- Microfuge 18
- Microfuge 22R
- Multifuge 3-SR
- UZ Discovery 90SE

Beckman-Coulter, FI, USA
 Beckman-Coulter, FI, USA
 Heraeus Instruments GmbH,
 Haunau
 (Sorvall) Thermo Scientific,
 Waltham, MA, USA

2.1.4. Organismen und Tiere

2.1.4.1. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E.coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80. <i>lacZ</i> . M15 . <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> . (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> Δ - <i>rpsL nupG</i> .	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E.coli</i> DH5 α	F- ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E.coli</i> Sure	e14-(<i>McrA</i> -) (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac</i> <i>recB recJ sbcC umuC::Tn5</i> (Kanr) <i>uvrC</i> [F' <i>proAB lacIqZ.M15 Tn10</i> (Tetr)].	Stratagene, La Jolla, CA, USA
<i>E.coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> Δ M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.1.4.2. eukaryotische Zellen

Linie	Bezeichnung	Herkunft
HEK293T/17	Humane embryonale Nierenzellen, welche das T-Antigen von SV40 exprimieren	ATCC, Teddington, Middlesex, UK

2.1.4.3. *Mus musculus*

DMD^{mdx} C57BL/10ScSn-129SVJbezogen von Prof. Fink
(Heidelberg), Bestand eigen-
ständig weitergeführt, IBF,
Heidelberg

C57BL/10J

bezogen von Prof. Fink
(Heidelberg), Bestand eigen-
ständig weitergeführt, IBF,
Heidelberg

NMRI (Han)

Charles River, Wilmington, MA,
USA

C57BL/6NCrl

Charles River, Wilmington, MA,
USA

2.1.4.4. *Rattus Norvegicus*

Sprague Dawley (CD(SD))

Charles River, Wilmington, MA,
USA

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Arbeiten bei Raumtemperatur durchgeführt. Beim Umgang mit Mikroorganismen wurde darauf geachtet, dass ausschließlich sterile Lösungen, Medien, Gefäße, Pipetten und Pipettenspitzen verwendet wurden. Die Sterilisation von Flüssigkeiten erfolgte entweder durch Sterilfiltration oder im Dampfautoklaven für 45 min, 120°C und bei einem Bar Überdruck. Zur Überprüfung der vielfältigen, klonierten oder mutierten DNA-Plasmide wurden wenigstens einfache, bei unklaren Ergebnissen beidseitige Sequenzierungen (*MWG Biotech AG*) vorgenommen.

2.2.1.1. Herstellung und Transformation chemisch Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter DH10B bzw. DH5α wurde eine bei -80°C gelagerte Dauerkultur auf Eis aufgetaut, anschließend auf einer LB-Platte ohne Antibiotikum ausgestrichen und bei 37°C für 16h inkubiert. Eine so entstandene Einzelkolonie wurde dann in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotikum überführt und ebenfalls für 16 h bei 37°C inkubiert. Von der Bakteriensuspension wurde 1 ml in 100 ml 37°C warmes LB-Medium ohne Antibiotikum überführt und bei 37°C und 200 UpM inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,45 erreicht wurde. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis und mit sterilen, vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Die Kultur wurde nun für 15 min heruntergekühlt, anschließend erfolgte die Pelletierung der Bakterien durch Zentrifugation bei 3000 UpM für 15 min bei 4°C. Das so entstandene Pellet wurde in 30 ml Tfb1-Lösung aufgenommen und erneut durch Zentrifugation pelletiert. Die Bakterien wurden nun in 5 ml Tfb2-Lösung resuspendiert, in 200 µl Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur Transformation wurde ein 200 µl-Aliquot auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid DNA vermischt. Es folgte eine Inkubation des Gemisches für 30 min auf Eis, dann ein

Hitzschock bei 42°C für 45 sek und die Zugabe von 1 ml Raumtemperatur warmem LB-Medium. Die Bakteriensuspension wurde nun für 1 h bei 37°C und 750 UpM im Thermomixer (*Eppendorf*, Hamburg) inkubiert. Von dieser Suspension wurden 200 µl auf eine mit dem Plasmid entsprechenden Antibiotikum versetzten LB-Agarplatte ausgestrichen und für 16 h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.2. Plasmidpräparation aus Bakterien

Für die Plasmidpräparation in kleinem Maßstab (Mini) wurde das Fast Plasmid Mini Kit der Firma *Eppendorf* (Hamburg) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Hierzu wurden 2 ml einer 5 ml Übernachtskultur durch Zentrifugation pelletiert, anschließend enzymatisch aufgeschlossen und auf eine Silica-Membran geladen. Diese wurde dann gewaschen, um störende Komponenten (Proteine) zu entfernen und die DNA mit bidestilliertem H₂O eluiert.

Für Plasmidpräparationen in großem Maßstab (Maxi, Giga) wurde das „Qiagen Plasmid Maxi/Giga Kit“ nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurde in beiden Fällen die Übernachtskultur (500 ml, 4000 ml) durch Zentrifugation pelletiert und die pelletierten Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Nach anschließender Neutralisation wurden ausgefallene Komponenten durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand auf die Säulen gegeben um störende Komponenten (RNA, Proteine) durch Waschschrte zu entfernen. Die Elution der DNA erfolgte mit einem hoch salzhaltigen Puffer und die anschließende Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von Isopropanol und Zentrifugation.

2.2.1.3. Isolation viraler und genomischer DNA aus Gewebe

Die Isolation genomischer DNA und episomaler Virus - DNA aus Geweben erfolgte mittels „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (*Qiagen*) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA oder RNA sowie zur Bestimmung der Optischen Dichte von Bakteriensuspensionen wurde der Nanodrop ND-1000 (*Nanodrop*, Wilmington, USA) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die jeweiligen Lösungen wurden bei diesem System unverdünnt vermessen. Dabei gilt:

$$OD_{260}=1 \triangleq 50\mu\text{g doppelsträngiger DNA}$$

$$OD_{260}=1 \triangleq 40\mu\text{g einzelsträngiger RNA oder DNA}$$

$$OD_{600}=1 \triangleq 10^8 \text{ Zellen/ml}$$

Die Bestimmung der Reinheit von DNA - und RNA - Lösungen erfolgte anhand des Absorptionsverhältnisses der Wellenlängen 260 nm zu 280 nm, welche das Verhältnis DN/RNA zu Proteingehalt darstellt, und 240 nm zu 260 nm, welche das Verhältnis DNA/RNA zum Salzgehalt der Lösung darstellt. Für qualitativ hohe DNA/RNA sollte der Quotient optimaler Weise einen Wert von 1,8 bis 2,0 aufweisen.

2.2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten wurden je nach Größe (0,5 – 10 kb) der zu trennenden Fragmente 0,8 - 1% (w/v) Gele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurden entsprechende Mengen Agarose in TBE – (Tris – Borat – EDTA) Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, die Lösung auf 60°C abgekühlt und mit 0,4 µg/ml des interkalierenden Ethidiumbromid versetzt, um eine spätere Visualisierung der Nukleinsäuren zu ermöglichen. Nach Polymerisation des Gels wurde dieses in der Elektrophoresekammer mit TBE – Puffer überschichtet und mit Proben bzw. 5 µl des 100 bp DNA - Markers (*New England BioLabs*, Ipswich, MA, USA) oder 10 µl des 2-log DNA - Markers (*New England BioLabs*, Ipswich, MA, USA) beladen. Die Auftrennung der Nukleinsäurefragmente erfolgte bei einer Spannung von 10 V/cm Gel für 1 - 2 Stunden. Die Analyse der nach Auftrennung erfolgte unter UV – Licht ($\lambda = 245$ nm) mittels eines Geldokumentationssystems (Alpha Digidoc 1000, Alpha Innotech).

2.2.1.6. Extraktion von DNA – Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von Nukleinsäurefragmenten aus Agarosegelen erfolgte in der Regel nach Behandlung der DNA mit Restriktionsendonukleasen oder nach Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase – Kettenreaktion. Dazu wurden die Fragmente elektrophoretisch getrennt (Kap. 2.2.1.5), anschließend unter UV – Licht visualisiert ($\lambda = 302$ nm) und die entsprechenden Fragmente mittels Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers über eine Silica-Säule aufgereinigt und mit 50 µl bidestilliertem H₂O eluiert.

2.2.1.7. Ligation doppelsträngiger DNA – Fragmente

Um unspezifische Autoligationen der einzelnen DNA – Fragmente zu verhindern, ist es sinnvoll, eines der zu ligierenden Fragmente (präferentiell der Zielvektor) einer

Phosphatasebehandlung zu unterziehen. Hierzu wurde die Alkalische Phosphatase aus *Pandalus borealis* (Nordatlantik – Garnele) verwendet, welche die 5′ - Phosphatreste von DNA und RNA abspaltet, die für Ligasen essentiell sind, um eine Verbindung der freien 3′ - Hydroxylgruppen mit 5′ - Phosphatresten zu ermöglichen. Somit ist die Zirkularisation von DNA – Fragmenten nur durch den Einbau eines Fragmentes mit phosphorylierten Enden möglich.

Die Ligation von DNA – Fragmenten erfolgte mit Hilfe des „t4 DNA Ligation Kit“ (NEB) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde zunächst die Konzentration der zu ligierenden Fragmente mittels ND - 1000 (*Nanodrop*) bestimmt. Für die Ligungsreaktion von kohäsiven DNA – Enden wurden Vektor und Insert im molaren Verhältnis 1:3 bzw. 1:10 eingesetzt und für 2 – 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ligationsansatz wurde dann zur Transformation in Bakterien verwendet.

2.2.1.8. Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Die PCR („Polymerase chain reaction“) dient *in vitro* der Vervielfältigung bestimmter DNA – Abschnitte, basierend auf einem Vorlagenstrang. Das Grundprinzip besteht aus drei Teilschritten, die in mehrfacher Wiederholung ausgeführt werden, wobei theoretisch jeder Zyklus zu einer Verdopplung neu synthetisierter DNA führt. Zu den drei Teilschritten gehören (1) Denaturierung des Vorlagenstrangs, (2) Anlagerung von Oligonukleotiden und (3) Elongation der Zielsequenz, ausgehend vom 3′Ende des Oligonukleotides, durch die eingesetzte Polymerase. Dabei spielt die Wahl der Polymerase eine entscheidende Rolle um eine erfolgreiche Vervielfältigung auch nach mehreren Zyklen zu gewährleisten. Dazu bieten sich thermostabile Polymerasen wahlweise mit (*Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*) oder ohne (*Taq*-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*) Korrekturlesefunktion an.

2.2.1.9. Standard – PCR zur Genotypisierung

Zur Überprüfung des Vorhandenseins einer bestimmten Punktmutation im Genom der Mdx – Maus wurde ein 474 bp langes Teilstück zwischen Intron 23 und Exon 23 des Dystrophingens mittels PCR amplifiziert, Zur Amplifikation wurde folgende Vorschrift verwendet:

Genomische DNA aus Schwanzbiopsien	1 µl
dNTP – Mischung (25mM, Roche)	0,2 µl
Primer (10pmol/µl)	je 1 µl
10x Puffer (Qiagen)	2 µl
H ₂ O	14,7 µl

Taq – Polymerase (Qiagen)	0,1 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Die einzelnen Komponenten wurden alle auf Eis zusammengeführt und anschließend mit folgendem Programm zur Amplifikation in die PCR – Maschine gestellt:

Initiale Denaturierung	94°C, 5 min	1 Zyklus
Denaturierung	94°C, 15 sek	30 Zyklen
Anlagerung	57°C, 1 min	
Elongation	72°C, 1 min	
Finale Elongation	72°C, 5 min	1 Zyklus
Reaktionsende	4°C	

Anschließend wurde der gesamte PCR – Ansatz auf ein Agarosegel geladen, aufgereinigt und sequenziert (*MWG Biotech*).

2.2.1.10. Herstellung des dsAAV-CMV_{enh}-MLC0.26kb-EGFP

Ziel dieser Klonierung war es den vorhandenen CMV – Promotor der pdsAAV-CMV-EGFP (Wang *et al.*, 2003) durch den 250bp großen, kardial spezifischen, CMV – verstärkten Myosin – Leichtketten – Promotor (MLC= Mynosine Light Chain Promotor) zu ersetzen. Dazu wurde der CMV_{enh}-MLC0.26 – Promotor mittels PCR aus dem pUF-CMV_{enh}-MLC0.26kb-Luc – Plasmid amplifiziert. Zusätzlich zur Amplifikation wurden während der PCR, durch modifizierte Oligonukleotide, am 5'-Ende und 3'-Ende des Amplifikats Sequenzen für spezifische Restriktionsschnittstellen (5'-MluI, 3'-HindIII) eingebaut. Die Amplifikation des Promotors erfolgte nach folgender Vorschrift:

pUF-CMV _{enh} -MLC0.26kb-Luc	10 ng
dNTP – Mischung (25mM, Roche)	1 µl
Primer (10pmol/µl)	je 3 µl
10x Puffer (Roche, 15mM MgCl ₂)	10 µl
H ₂ O	ad 100 µl
High Fidelity – Polymerase (Roche)	1 µl
Gesamtvolumen	100 µl

Die einzelnen Komponenten wurden alle auf Eis zusammengeführt und anschließend mit folgendem Programm zur Amplifikation in die PCR – Maschine gestellt:

Initiale Denaturierung	94°C, 2 min	1 Zyklus
Denaturierung	94°C, 30 sek	30 Zyklen
Anlagerung	62°C, 2 min	
Elongation	72°C, 1 min	

Finale Elongation Reaktionsende	72°C, 5 min 4°C	1 Zyklus
------------------------------------	--------------------	----------

Anschließend wurde der gesamte PCR – Ansatz auf ein Agarosegel geladen und augereinigt. Danach wurden sowohl das PCR – Produkt als auch der Zielvektor pdsAAV-CMV-EGFP mit den Restriktionsendonukleasen MluI und HindIII inkubiert. Zusätzlich dazu wurde der Zielvektor mit einer alkalischen Phosphatase behandelt (Kap. 2.2.1.7) um eine Eigenzirkularisierung während der im Anschluss an den Restriktionsverdau stattfindenden Ligation beider Fragmente zu verhindern. Der komplette Ligationsansatz wurde dann in DH5α transformiert (Kap. 2.2.1.1).

2.2.1.11. Subklonierung der Mikrodystrophin cDNA

Klonierung der verkürzten Dystrophin cDNA in einen AAV-Vektor

Ziel dieser Klonierung war es die Luziferase des pUF-CMV_{enh}-MLC0.26kb-Luc durch eine verkürzte Dystrophin cDNA (μDys) zu ersetzen (Jorgensen *et al.*, 2009). Dazu wurde die cDNA, welche an 5' und 3', zum Zielvektor kompatible, XbaI - Restriktionsschnittstellen enthielt und bereits mit XbaI behandelt wurde, mit dem mit XbaI linearisierten und geextrahierten (Kap. 2.2.1.6) Zielvektor ligiert und anschließend in Bakterien transformiert.

Entfernung der untranslatierten Regionen (UTR) aus der Dystrophin cDNA

Aufgrund der Überschreitung des Verpackungslimits von 4,8 kb war es Ziel dieser Klonierung das mikro – Dystrophin (μDys) um den 5' untranslatierten Bereich und das 3' Polyadenosinende zu verkürzen. Dazu wurde das μDys mittels Linker-PCR 5' und 3' mit NotI – Restriktionsschnittstellen versehen um später das GFP_h im pTR-UF5-CMV-GFP_h zu ersetzen. Die Amplifikation des μDys erfolgte nach folgender Vorschrift:

pUF-CMV _{enh} -MLC0.26kb-μDys(60ng)	1 μl
dNTP – Mischung (25mM, Roche)	1 μl
Primer (10pmol/μl)	je 1,5 μl
10x Puffer (Roche, 15mM MgCl ₂)	5 μl
H ₂ O	40,5 μl
High Fidelity – Polymerase (Roche)	1 μl
Gesamtvolumen	50 μl

Die einzelnen Komponenten wurden alle auf Eis zusammengeführt und anschließend mit folgendem Programm zur Amplifikation in die PCR – Maschine gestellt:

Initiale Denaturierung	94°C, 2 min	1 Zyklus
------------------------	-------------	----------

Denaturierung	94°C, 30 sek	10 Zyklen
Anlagerung	59°C-54°C, 30 sek	
Elongation	68°C, 3 min	
Denaturierung	94°C, 30 sek	25 Zyklen
Anlagerung	54°C, 30 sek	
Elongation	68°C, 3 min	
Finale Elongation	68°C, 10 min	1 Zyklus
Reaktionsende	4°C	

Anschließend wurde der gesamte PCR – Ansatz auf ein Agarosegel geladen, welches statt Ethidiumbromid den Farbstoff Kristallviolett (2mg/ml) enthielt, aufgereinigt und nach Angaben des Herstellers in den pCR8/GW/TOPO (*Invitrogen*) subkloniert. Nach Sequenzierung wurde das im TOPO - Vektor befindliche μ Dystrophin mittels Behandlung der Restriktionsendonuklease NotI aus dem Topo – Vektor extrahiert und in den mit NotI behandelten, linearisierten Zielvektor pTR-UF5-CMV ligiert. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz in Bakterien transformiert (Kap. 2.2.1.1). Daraus entstandene Einzelkolonien wurden mittels NotI - Restriktionsbehandlung und Sequenzierung hinsichtlich korrekter Integration in den Zielvektor überprüft. Es entstand das Zwischenkonstrukt pTR-UF5-CMV- μ Dys-lackUTR.

Klonierung des pTR-UF5-CMV_{enh}-MLC0.26kb- μ Dys-lackUTR/Neo

Im ersten Schritt wurde, um das Verpackungslimit der AAV - Vektoren nicht zu überschreiten, das Neomycinresistenz (Aminoglykosidase) aus dem Zwischenkonstrukt pTR-UF5-CMV- μ Dys-lackUTR mittels Behandlung durch Restriktionsendonuklease Sall und anschließender Gelextraktion entfernt. Der so entstandene linearisierte Vektor wurde mittels Ligation rezirkualisiert. Es entstand das Zwischenkonstrukt pTR-UF5-CMV- μ Dys-lackUTR/Neo.

Im zweiten Schritt war es nötig den unspezifischen CMV – Promotor durch den bereits erwähnten herzmuskelspezifischen CMV_{enh}-MLC0.26kb – Promotor zu ersetzen. Dazu wurde dem CMV_{enh}-MLC0.26kb mittels Linker – PCR 3' eine XbaI – Restriktionsschnittstelle angefügt:

pUF-CMV _{enh} -MLC0.26kb- μ Dys	10 ng
dNTP – Mischung (25mM, Roche)	1 μ l
Primer (10pmol/ μ l)	je 3 μ l
10x Puffer (Roche, 15mM MgCl ₂)	10 μ l

H ₂ O	ad 100 µl
High Fidelity – Polymerase (Roche)	15 µl
Gesamtvolumen	100 µl

Die einzelnen Komponenten wurden alle auf Eis zusammengeführt und mit folgendem Programm zur Amplifikation in die PCR – Maschine gestellt:

Initiale Denaturierung	94°C, 2 min	1 Zyklus
Denaturierung	94°C, 30 sek	10 Zyklen
Anlagerung	65°C-55°C, 30 sek	
Elongation	68°C, 1 min	
Denaturierung	94°C, 30 sek	25 Zyklen
Anlagerung	55°C, 30 sek	
Elongation	68°C, 1 min	
Finale Elongation	68°C, 5 min	1 Zyklus
Reaktionsende	4°C	

Anschließend wurde der gesamte PCR – Ansatz auf ein Agarosegel geladen und aufgereinigt. Danach wurden sowohl das PCR – Produkt als auch der Zielvektor mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und XbaI inkubiert. Zusätzlich dazu wurde der Zielvektor noch mit einer alkalischen Phosphatase (Kap. 2.2.1.7) behandelt um eine eventuelle Eigenzirkularisierung des Zielvektors während der Ligation zu verhindern. Der komplette Ligationsansatz wurde dann in DH10B transformiert (Kap. 2.2.1.1).

2.2.1.12. Zielgerichtete Mutagenese

Zur Korrektur einer unerwünschten Einzelbasendeletion in der Mikrodystrophin cDNA des pUF-CMV_{enh}-MLC0.26kb-µDys (Kap. 2.2.1.11) und des TOPO-µDys-Zwischenkonstruktes (Kap. 2.2.1.11) wurde eine „QuickChange Site directed Mutagenesis“ nach Angaben des Herstellers (*Stratagene*) durchgeführt. Das Prinzip gleicht in der Regel dem der Taq – PCR mit (1) Denaturierung, (2) Anlagerung der Oligonukleotide und (3) Elongation der Oligonukleotide, nur das hier Oligonukleotide verwendet werden, die ein zusätzliches und der Vorlagensequenz nicht kompatibles Nukleotid enthalten. Dadurch entstehen während der Mutagenese - PCR Plasmide, mit veränderter Nukleotidsequenz. Anschließend wird der methylierte Vorlagenstrang mittels DpnI (*Diplococcus pneumoniae*) selektiv geschnitten, um bei der Transformation des mutierten Plasmides in *E.coli* XL1-blue eine Vervielfältigung des Vorlagenplasmides auszuschließen.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Arbeiten bei Raumtemperatur durchgeführt und alle Lösungen auf 37°C vorgewärmt. Beim Umgang mit Zellen wurde darauf geachtet, dass ausschließlich sterile Lösungen, Medien, Gefäße, Pipetten und Pipettenspitzen verwendet wurden. Die Sterilisation von Flüssigkeiten erfolgte entweder durch Sterilfiltration oder im Dampfautoklaven für 45 min, 120°C und einem Bar Überdruck.

2.2.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die hier verwendeten HEK293T – Zellen wurden nach dem Auftauen in Dulbeccos modified Eagle Medium, welchem 10% foetales Kälberserum, 2 mM L- Glutamin und 0,02 mg/ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde (DMEM(+++)), aufgenommen, bei 1000 UpM pelletiert und anschließend in 15 ml DMEM(+++) resuspendiert. Die Zellen wurden dann in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit Filterdeckel gegeben und bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchte im Inkubator kultiviert. Die Vervielfältigung der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 90 – 100%. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, selbige dann mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2 ml 0,25% Trypsin-EDTA von der Kulturflasche gelöst. Um die Reaktion zu stoppen und die Zellen aus der Kulturflasche umzufüllen, wurden 8 ml DMEM(+++) zu den abgelösten Zellen gegeben und durch mehrfaches auf – und abpipettieren der Suspension die Zellen vereinzelt. Jeweils 1 ml der Zelllösung wurde dann in eine 175 cm² Zellkulturflasche, mit zuvor 25 ml vorgelegtem DMEM(+++) überführt. Zur Kryokonservierung der Zellen wurden vorher durch Zentrifugation pelletierte 2x10⁶ Zellen in 2 ml FCS(+10% DMSO) gelöst, in Kryoröhrchen überführt und in einen mit Ethanol befüllten Einfriercontainer (Nalgene) bei -80°C langsam eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.2. Standard – Transfektion eukaryotischer Zellen

Am Vortag der Transfektion wurden 4,5x10⁵ HEK293T – Zellen pro Vertiefung einer 6 - well – Platte in antibiotikafreiem DMEM(++ø) ausgesät. Vor der Transfektion wird das DMEM(++ø) von den Zellen abgesaugt und mit 250 µl des Transfektionsmediums Opti-MEM (*Invitrogen*) überschichtet. Anschließend erfolgt die Zusammenstellung des Transfektionsansatzes pro Vertiefung:

Ansatz A

Ansatz B

Plasmid DNA	4 µg	Lipofectamine 2000	4 µl
Opti-MEM	250 µl	Opti-MEM	250 µl

Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurden beide Ansätze miteinander vereint. Damit sich DNA:Lipofectamine – Intermediate bilden können ist eine weitere Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur erforderlich. Der fertige Transfektionsansatz wurde dann für 8 h bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchte auf die Zelle gegeben, welche nach dieser Inkubation mit 2,5 ml DMEM(++ø) überschichtet wurden.

2.2.3. Produktion und Aufreinigung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren (AAV)

Alle Arbeiten wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Beim Umgang mit Zellen und Viren, wurde darauf geachtet, dass ausschließlich sterile Lösungen, Medien, Gefäße, Pipetten und Pipettenspitzen verwendet wurden. Die Sterilisation von Flüssigkeiten erfolgte analog zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen.

2.2.3.1. Transfektion eukaryotischer Zellen zur AAV-Produktion

Voraussetzung für die Transfektion ist die Aussaat von Zellen. Dazu wurden an Tag eins $2,3 \times 10^8$ HEK293T – Zellen mit 1 Liter DMEM(+++) vermischt. Von dieser Lösung wurden 25 ml in eine 175 cm² Zellkulturflasche, welche der Transfektionskontrolle dienen soll, überführt. Der Rest des Gemisches aus Zellen und Medium diente der Aussaat in einen 10 - Kammer - Zellstapel (*Corning*), welcher einer Grundfläche von ca. 40 x 175 cm² entspricht.

Zur Produktion rekombinanter AAV9 – Viren erfolgt an Tag zwei eine dreifach – Transfektion, bestehend aus, (1) dem Vektorplasmid, welches von den Inverted Terminal Repeats (ITR) flankiert wird, (2) dem p5E18-VD2-9, welches die Gene der Kapsid – und Replikationsproteine trägt und (3) dem pDGdelVP, welches für die adenoviralen Helferproteine codiert.

Die Transfektion von AAV2(R484E;R585E) hingegen besteht aus (1) dem Vektorplasmid und (2) dem Kombinationsplasmid pDP2, welches für die Gene der Kapsid – bzw. Replikationsproteine und adenoviralen Helferproteine kodiert. Die Transfektion wurde mittels Poly – Ethylen - Imin (PEI) nach folgender Vorschrift vorgenommen:

Mix 1

Reporterplasmid	325 µg
Adenohelfer – bzw. Kombiplasmid	1525 µg
Kapsidplasmid	392 µg
H ₂ O	ad 34,5 ml
NaCl (300mM)	34,5 ml
Gesamtvolumen	69 ml

Mix 2

PEI (0,323g/l)	15,5 ml
H ₂ O	19 ml
NaCl (300mM)	34,5 ml
Gesamtvolumen	69 ml

Mix 2 wurde dann in Mix 1 überführt, alles miteinander vermischt und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Vom Transfektionsansatz wurden 4 ml für die vorgesehene Kontrollflasche abgenommen, der restliche Ansatz wurde in den 10 - Kammer – Zellstapel überführt und durch siebenmaliges Drehen des Zellstapels mit dem dort befindlichen Medium gemischt.

2.2.3.2. Aufreinigung rekombinanter AAV

Die Ernte der AAV erfolgte drei Tage nach Transfektion (Kap. 2.2.3.1) durch resuspendieren der Zellen im Medium. Dazu wurde der Zellstapel horizontal mehrfach geschüttelt und das so entstandene Gemisch aus Zellen und Medium in Zentrifugenbecher überführt. Die Pelletierung der Zellen erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 4000 UpM und 4°C. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal mit 10 ml PBS gewaschen.

Zur Lyse der Zellen und Freisetzung der Viren erfolgte die Aufnahme der Zellen in 10 ml Lysepuffer mit anschließender dreifacher Frier – Tau – Kaskade (flüssiger N₂/Auftauen bei 37°C im Wasserbad). Die in Lysepuffer befindlichen Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 1000 UpM und 4°C pelletiert. Der Überstand, welcher die freigesetzten Viren enthält, wurde in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Das Pellet wurde nochmals in 5ml Lysepuffer aufgenommen und zweifach gefroren/aufgetaut. Auch hier wurde nach Zentrifugation der Überstand gesammelt und das Pellet wieder in 5 ml Lysepuffer aufgenommen, welches im dritten Schritt einmal gefroren/aufgetaut wurde. Zur Entfernung von frei im Überstand vorliegender DNA (Plasmid, genomisch), welche die spätere Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der Viren beeinflussen könnte, wurden sowohl der bereits gesammelte Überstand als auch die Zellen in Lysepuffer mit 50 U/ml

Benzonase (Endonuklease aus *Serratia marcescens*, *Sigma-Aldrich*) für 30 min bei 37°C im Wasserbad behandelt. Danach wurde die Lysepuffer-Zellsuspension ebenfalls zentrifugiert und der Überstand gepoolt.

Die Aufreinigung der im Überstand befindlichen AAV's erfolgte mittels Iodixanol – Stufengradient (Kap. 2.1.2.4), bei dem die einzelnen Phasen, beginnend mit dem gesammelten Überstand, gefolgt von den 15% - 60%igen Lösungen, in ein Zentrifugenröhrchen unterschichtet werden. Nach Verschluss des Zentrifugenröhrchens (*Beckmann*) erfolgte die Trennung der im Überstand befindlichen Partikel durch Ultrazentrifugation bei 50.000 UpM, 4°C für 2 h. Dabei sammeln sich die Viruspartikel in der 40%igen Iodixanolfraktion an und können so mit einer Spritze selektiv abgezogen werden. Die langfristige Lagerung der Viren erfolgte bei -20°C.

2.2.3.3. Quantifizierung rekombinanter AAV

Die Quantifizierung rekombinanter AAV wurde mittels quantitativer Realtime PCR nach (Hauswirth *et al.*, 2000; Veldwijk *et al.*, 2002) von Barbara Leuchs in der Virusproduktionsabteilung des Deutschen Krebsforschungszentrums durchgeführt.

2.2.3.4. Beladung von Mikrosphären mit rekombinanten AAV

AAV-beladene Mikrosphären (Mikrosphären) wurden mit leichten Modifikationen wie in (Bekeredjian *et al.*, 2003) beschrieben produziert. Dazu wurden 500 µl eines Gemisches aus 4×10^{10} genomischen AAV2 - Partikeln, 1% DL- α -phosphatidylcholin (*Sigma*), 0.25% DL- α -phosphatidylethanolamin (*Sigma*) und 10% Glycerol für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit Octafluoropropan überschichtet, für 20 s bei 4300 Hz geschüttelt (Capmix 3M) und mit 500 µl PBS verdünnt. Die Größe und Konzentration der Mikrosphären wurde kurz vor Injektion des Versuchstieres mit dem Multisizer 3 bestimmt. Die Kontrolle der Bindung von AAV an die Oberfläche der Mikrosphären erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Dazu wurden AAV2 beladene Mikrosphären für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit dem A20 – Antikörper in einer Verdünnung 1:100 inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit einem Cy3 gekoppelten rabbit anti mouse – Antikörper (1:500 Verdünnung) für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln (Müller *et al.*, 2008b).

Anschließend erfolgte nach dreimaligem Waschen die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie (*Nikon*).

2.2.4. Biochemische Methoden

2.2.4.1. Proteinaufreinigung aus Zellen

Zur Aufreinigung von Proteinen aus Zellen einer Vertiefung einer 6-well-Platte wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 100 µl RIPA - Puffer (Kap. 2.1.2.5.) abgeschabt. Um störende Zelltrümmer aus der Suspension zu entfernen wurde das Gemisch für 3 min bei 10.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde anschließend in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

2.2.4.2. Proteinaufreinigung aus Geweben

Die Aufreinigung von Proteinen aus Gewebestücken erfolgte analog zur Proteinaufreinigung der Zellen mit RIPA-Puffer (Kap. 2.1.2.5). Dazu wurden 100 mg tiefgefrorenes Gewebe mit 500 µl RIPA-Puffer bei 30 Hz für 2 min in der Kugelmühle homogenisiert. Zur Pelletierung unerwünschter Zelltrümmer wurde das Homogenisat für 10 min bei 3.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein frisches 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt und bei -80°C gelagert.

2.2.4.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen nach Homogenisierung von Zellen bzw. Geweben in RIPA-Puffer erfolgte nach Angaben des Herstellers mittels „DC Protein Assay“ (*Bio-Rad*), dessen Farbumschlagsintensität photometrisch ($\lambda = 270$ nm) ausgelesen wurde.

2.2.4.4. Luziferase – Aktivitätsbestimmung in lysierten Gewebeproben

Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden die gefrorenen Gewebeproben für 2 min, 30 Hz mittels Kugelmühle in Reporter Lyse-Puffer (*Promega*) homogenisiert und für 10 min bei 10.000 UpM zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde anschließend verwendet, um die Luziferaseaktivität mittels „Luciferase Assay System“ (*Promega*) in einem Luminometer (Lumat LB9051) zu bestimmen. Zur Normalisierung der Luziferaseaktivität wurde mittels „NanoOrange Protein Quantitation Kit“ (*Invitrogen*) die Proteinkonzentration des Überstandes ermittelt, so

dass die Luziferaseaktivität in relativen Lichteinheiten (RLE) pro Milligramm Protein angegeben werden konnte.

2.2.4.5. SDS-Polyacrylamid – Gelelektrophorese

Die Auftrennung von aufgereinigten Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgte mittels Tris - Acetat SDS - Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Grundlage dieser Auftrennung ist die Bindungseigenschaft des Natriumdodecylsulfates (SDS) an Proteine, wobei die Eigenladung der Proteine maskiert und mit dem negativ geladenen SDS bedeckt werden. Aufgrund der negativen Ladung und der Vernetzungsdichte des Polyacrylamids werden alle Proteine der Größe nach durch das kontinuierlich angelegte elektrische Feld über die Gelmatrix aufgetrennt. Für die hier Elektrophorese wurden Tris – Acetat – Gradientengele (4 - 8%, *Invitrogen*) verwendet, welche die Auftrennung von Proteinen > 400 kDa ermöglichen. Die maximale Beladungsmenge der Gele entsprach 100 µg Protein, welche mit „NuPage Sample Buffer“, „NuPage Reducing Agent“ (*Invitrogen*) und H₂O auf 25 µl Endvolumen versetzt wurde. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 90 V bis die gefärbte Laufront das Gelende erreichte.

2.2.4.6. Western – Blot

Der Nachweis von Proteinen erfolgte durch eine Immunodetektion nach Transfer mittels „Tank-Blot“ – Verfahren auf eine PVDF – Membran. Dazu wurde die SDS - PAGE nach Auftrennung der Proteine auf ein Schichtsystem aus einer unteren Lage in Transferpuffer getauchtes Fließ, gefolgt vom Whatmanpapier und der äquilibrierten PVDF – Membran gelegt. Das Gel wurde anschließend mit einer Lage Whatmanpapier und einer Lage Fließ bedeckt. Das komplette Schichtsystem wurde dann in eine PVC - Halterung eingespannt und in der Tank – Blot – Apparatur (Transblot-Mini-Cell, *BioRad*) platziert. Der Tank wurde dann bis zur Markierung mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 4°C bei einer konstanten Spannung von 30 V für 16 h.

Der erste Schritt in der Immunodetektion der Proteine war die Absättigung der Membran und die Arretierung der Proteine durch eine Inkubation mit Blockingpuffer für mindestens 1h bei Raumtemperatur. Dem folgte eine dreistündige Inkubation der Membran bei Raumtemperatur mit dem in Blockingpuffer verdünnten Erstantikörper unter geringer Kippbewegung. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBST gewaschen, dann für eine Stunde mit dem in Blockingpuffer verdünnten,

fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals mit PBST gewaschen. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mittels „Odyssey Infrared Imaging System“ (LI-COR).

2.2.5. Tiermodell *Mus musculus*

2.2.5.1. Haltung und Behandlung von *Mus musculus*

Die Haltung der hier verwendeten Versuchstiere erfolgte in der interfakultären biomedizinischen Forschungseinrichtung unter Tierschutzrechtlichen Bestimmungen. Zur Standardisierung wurden alle Tiere in einer klassischen Barrierehaltung in Makrolonkäfigen vom Typ II bei einem automatisierten 12 h Tag - / Nachtrhythmus gehalten. Die Behandlung zur Therapie der Tiere erfolgte über Injektionen in Schwanzvene.

2.2.5.2. Euthanasierung und Organentnahme

Die Euthanasierung der Tiere zum Zweck der Organentnahme erfolgte durch Kohlendioxid und anschließender zervikaler Dislokation. Die Konservierung der einzelnen Organe erfolgte, je nach weiterem Untersuchungszweck, auf unterschiedliche Weise. So war es für die Konservierung von DNA und RNA notwendig, die Gewebestücke in flüssigem Stickstoff einzufrieren. Im Gegensatz dazu erfolgte die Konservierung der Organe für histologische Untersuchungen je nach späterer Anwendung (Kap. 2.2.7).

2.2.5.3. Troponin T – und Kreatinkinasebestimmung in Blutproben

Die Kreatinkinase ist, durch die Übertragung eines Phosphors auf ADP, ein essentielles Enzym zur ATP - Regeneration quergestreifter Muskulatur. Durch Schädigung von Herz – bzw – Skelettmuskulatur wird dieses Enzym vermehrt in den Blutkreislauf abgegeben und kann deshalb als nicht invasives diagnostisches Hilfsmittel herangezogen werden. Um genauer zwischen Herz – und Skelettmuskelschädigung zu differenzieren, wird bei Verdacht auf Herzmuskelschädigung der Troponingehalt im Blut bestimmt. Das kardiale Troponin ist maßgeblich an der Kontraktion von Herzmuskelzellen beteiligt. Durch Schädigung der Herzmuskulatur gelangt das intrazelluläre Protein in den Blutkreislauf, wodurch sich nicht invasiv eine Schädigung am Herzmuskel diagnostizieren lässt.

Zur Bestimmung des Kreatinkinasegehaltes und des kardialen Troponins wurde Mäusen final 1 - 2 ml Blut aus dem Retroorbitalplexus mit Hilfe von Hämatokrit - Kapillaren (*Hirschmann Laborgeräte*) entnommen, in mit Heparin beschichtete Microtainer Tubes (*BD Bioscience*) überführt und mehrfach invertiert. Um das für die Analysen notwendige Plasma zu gewinnen, wurden die festen Blutbestandteile mittels Zentrifugation für 10 min bei 13.000 UpM pelletiert. Anschließend wurden 200 µl Serum in 15 ml-Röhrchen überführt und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 500 µl aufgefüllt. Die Analyse selbst wurde vom Diagnoselabor des Analysezentrums des Universitätsklinikums Heidelberg durchgeführt.

2.2.5.4. Extrakardiale Messungen: Fraction of shortening

Die transthorakale Echokardiographie ist einer der wichtigsten nicht invasiven diagnostischen Verfahren in der Kardiologie. Hierbei können sowohl morphologische Parameter, als auch funktionelle Parameter des Herzens beurteilt werden.

Zur Bestimmung der Funktionalität und Größe des linken Ventrikels bei Mäusen war es erforderlich, die Tiere 1 - 2 Tage vor Untersuchung zu enthaaren. Die transthorakale Echokardiographie wurde von Dr. Raffi Bekeredjan (Innere Medizin III, Universitätsklinikum Heidelberg) mit Hilfe des Ultraschallgerätes Sonos 5500 und einem S12 Transducer (Philips) durchgeführt. Durch die hohe Impulswiederholungsfrequenz (12MHz) im M-Mode (M=motion) ist es möglich die Bewegungsabläufe des linken Ventrikels der Maus eindimensional darzustellen und den linksventrikulären enddiastolischen Diameter (LVEDD = maximale Erschlaffung des Herzens) und den linksventrikulären endsystolischen Diameter (LVESD = maximale Kontraktion des Herzens) zu vermessen. Daraus wurde dann die fraktionelle Verkürzung des linken Ventrikels (FS = Fractional Shortening = prozentuale systolische Durchmesser Verkürzung des linken Ventrikels) mit folgender Formel berechnet: $FS \% = [(LVEDD - LVESD) / LVEDD] * 100$

2.2.6. Tiermodell *Rattus norvegicus*

2.2.6.1. Haltung und Behandlung von *Rattus norvegicus*

Analog zur Haltung von *Mus musculus* erfolgte bei Ratten ebenfalls eine klassische Barrierehaltung bei einem automatisierten 12 h Tag - / Nachtrhythmus in Makrolonkäfigen vom Typ IV.

Vor Injektion der virushaltigen Microbubble – Lösung (Kap. 2.2.3.4) in das Versuchstier wurden die Ratten mit einer intraperitonealen Injektion aus 400 mg/kg 2,2,2 - Tribromethanol (*Sigma*) anästhesiert und im Bereich des Brustkorbes enthaart. Zur Applikation der Microbubble - Lösung wurde ein Polyethylenschlauch in die rechte *Vena jugularis* des Tieres eingeführt und der Ultraschallkopf über dem Brustkorb platziert. Die Microbubble – Lösung wurde nun mit einer konstanten Rate von 3 ml/h für 20 min infundiert. Dabei erfolgte die Zerstörung der Mikrosphären durch einen konstanten Ultraschall durch das Sonos 5500 Gerätes (*Philips*) unter Gebrauch eines S3 Schallkopfes, welcher im ultraharmonischen Modus (1.3 MHz) arbeitete (Müller *et al.*, 2008b). Die Euthanasierung der Ratten erfolgte analog zur Euthanasierung der Mäuse (Kap. 2.2.5.2).

2.2.7. Histologische Methoden

2.2.7.1. Kryokonservierung von Geweben

Voraussetzung für die Kryokonservierung von ganzen Organen oder Organteilen war es, diese mit Vorsicht aus dem Tier zu präparieren und durch spülen in PBS von Blutresten zu befreien. Die Organe wurden dann in das Kryokonservierungsmedium „Tissue Tek“ (*Leica*) eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -20°.

2.2.7.2. Kryoprotektive Konservierung von Geweben

Zur Konservierung von EGFP - haltigen Organen war es nötig, eine leichte Fixierung des Gewebes vor Einbettung in das Kryokonservierungsmedium vorzunehmen. Dazu wurden die Organe vorsichtig herauspräpariert und durch leichtes spülen in PBS von eventuellen Blutresten befreit. Anschließend erfolgte der Transfer der Organe in die Kryoprotektionmedium (Kap. 2.1.2.6), eine Inkubation für 4 h bei 4°C und die Kryokonservierung (Kap. 2.2.7.2) in Tissue Tek (*Leica*).

2.2.7.3. Dünnschnittpräparation von kryokonserviertem Gewebe

Bei der Erstellung von kryokonservierten Dünnschnittpräparaten (5 - 10 µm) ist einerseits eine konstante Umgebungstemperatur von -20°C erforderlich um das Auftauen der Präparate zu verhindern, andererseits aber eine variable Temperatur (-15 bis -20°C) nötig, um eine optimale Schnittleistung zu gewähren. Die Temperaturdifferenzen zwischen Umgebungstemperatur im Kryotom (*Leica*) und der

Probentemperatur werden eine separate Kühl – und Heizfunktion des Probenblockes erreicht. Nach Präparation des Dünnschnittes wird dieser auf einen Glasobjektträger aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.7.4. Fluoreszenzbasierte Immunodetektion auf Kryoschnitten

Zur Überprüfung von Expression und Lokalisation von Transgenen nach Transduktion mit AAV in verschiedenen Geweben, wurde eine fluoreszenzbasierte Immunodetektion gewählt. Diese wurde aufgrund der Notwendigkeit naiver Epitope auf Kryoschnitte angewendet. Dazu wurden Dünnschnittpräparate aus kryokonserviertem Gewebe (Kap. 2.2.7.3) erstellt, kurz an der Luft getrocknet und dann mit dem „Straptavidin/Biotin Blocking Kit“ behandelt (*Vector Laboratories*). Nach mehrfachem Waschen erfolgte die weitere Behandlung der Präparate nach Anleitung des Herstellers mittels „M.O.M. Immunodetection Kit“ (*Vector Laboratories*). Dabei wurde der Primärantikörper entsprechend der Angaben des Herstellers verdünnt und für 3h bei RT in der feuchten Kammer auf den Präparaten inkubiert. Nach mehrmaligem waschen der Präparate erfolgte die Anlagerung des im Kit vorhandenen biotinylierten Sekundärantikörpers an den F_c-Teil des Primärantikörpers in der feuchten Kammer für 10 min bei Raumtemperatur. Durch die Bindung eines FITC-gekoppelten Streptavidins an das Biotin des Sekundärantikörpers und die Eindeckelung der Präparate mit DAPI (Kernfärbemittel) – haltigem Eindeckelmedium (*Vector Laboratories*) wurde die Immunfluoreszenzfärbung abgeschlossen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie 90i (*Nikon*).

Um eine genauere Lokalisation des Transgens in Muskelzellen zu ermöglichen, erfolgte in einer Variante der oben beschriebenen Immunfluoreszenzfärbung nach Beendigung selbiger eine weitere Färbung für 20min in der feuchten Kammer mit Alexa Fluor 546 gekoppletem Phalloidin (Phalloxin aus *Amantia phalloides*, *Invitrogen*), welches irreversibel und spezifisch an filamentöses Aktin bindet.

2.2.7.5. Chemische Immunodetektion auf Kryoschnitten

Analog zur fluoreszenzbasierten Immunodetektion wird auch bei der chemischen Immunodetektion mit kryokonserviertem Gewebe gearbeitet. Grund dafür sind auch hier die naiven Epitope der zu detektierenden Strukturen. Die Durchführung der Immunodetektion erfolgte in drei Schritten. Als Erstes wurden die Präparate mit einer BSA - Blocklösung für 20min bei Raumtemperatur behandelt. Im zweiten Schritt erfolgte die Inkubation der Präparate mit in BSA - Lösung verdünntem, biotinylierten

Primärantikörper für 60min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Im dritten Schritt erfolgte die Anlagerung des Enzymgekoppelten Streptavidins an den biotinylierten Primärantikörper und die Zugabe des Substrates nach Angaben des Herstellers mittels „DAB Substrate Kit for Peroxidase“ (*Vector Laboratories*). Die Konservierung der Färbung wurde durch Dehydrierung der Präparate mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (96%, 100%, Xylol) und Eindeckelung mit Roti-Histokitt (*Carl-Roth*) erreicht.

2.2.7.6. Hämatoxylin Eosin Färbung

Eine der häufigsten Methoden zur Kombinationsfärbung von Kernen, Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagen ist die Hämatoxylin Eosin Färbung. Dabei werden im ersten Schritt dieser Färbung mit saurer Hämalanlösung (Hämatoxylin Mayer, *Sigma-Aldrich*), einer Verbindung aus dem natürlichen Pflanzenfarbstoff Hämatoxylin und Schwermetallanteilen (Eisen) des Alaunsalzes, die Kerne des Gewebes angefärbt. Dies geschieht zuerst durch Anlagerung des stark positiven Hämalan an die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren. Die eigentliche Anfärbung der Kerne (blau) entsteht anschließend durch Spülen des Präparates in Leitungswasser, was eine Verschiebung des pH in den neutralen bis alkalischen Bereich zur Folge hat und somit den Farbstoff im Kern fixiert. Nach weiterem Spülen der Präparate mit destilliertem Wasser erfolgte die Rotfärbung des Zytoplasmas, des Bindegewebes und des Kollagens mit dem schwach sauren Farbstoff Eosin (*Shandon*). Dieser muss nach der Färbung durch mehrfaches Spülen in destilliertem Wasser differenziert werden, da sonst die Gefahr besteht, dass überschüssiges Eosin in das Eindeckelmedium übertritt. Für die Konservierung der Färbung wurden die gefärbten Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%, 100%, Xylol) dehydriert und mit Roti-Histokitt eingedeckelt (*Carl-Roth*).

2.2.7.7. Van Gieson Färbung

Während andere Übersichtsfärbungen nur zwei Farbtönen ermöglichen und das Bindegewebe in der Regel den gleichen Farbton wie das Zytoplasma annimmt, wird während der van Gieson Färbung, einer Variante der Trichromfärbung, das Bindegewebe mit einer dritten Farbe kontrastiert. Die Färbung des Präparates erfolgte in drei einzelnen Färbeschritten, nach Anleitung der Hersteller mit dem „Elastic Stain Kit“ (*Sigma-Aldrich*), wobei am Ende des Färbeprozesses elastische

Fasern blauviolett, Zellkerne braunschwarz, kollagenes Bindegewebe rot und Cytoplasma, Muskeln und Erythrozyten gelb erscheinen.

2.2.8. *in silico* Arbeiten

Zur Analyse und Aufbereitung der in dieser Arbeit erzeugten Daten wurden folgende Programme verwendet:

Programm	Anwendungsbereich
Vector NTI 10 (Invitrogen)	Plasmidverwaltung
Sequencher 4.8 (Gene Codes Corp.)	Sequenzanalyse
EZC1 Freeviewer (Nikon)	konfokale Bildanalyse
Tierbase 5	Zuchtverwaltung
Adobe Photoshop CS2 (Adobe)	Bildanalyse
Adobe Illustrator CS2 (Adobe)	Erstellung von Abbildungen
SPSS (IBM)	Statistische Auswertungen
Odyssey (LiCOR)	Auswertung von Western Blots

3. Ergebnisse

3.1. Genotypisierung der Dystrophin defizienten Mauslinie DMD^{mdx}

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die initialen Zuchtpaare der Linie DMD^{mdx} - Maus (Mdx) hinsichtlich der in der Literatur beschriebenen homozygoten Punktmutation im X-Chromosom überprüft (Bulfield *et al.*, 1984). Dazu wurde die genomische DNA aus Schwanzbiopsien der Maus isoliert (Kap. 2.2.1.3) und ein 474 bp langes Teilstück zwischen Intron 23 und Exon 23 des Dystrophingens mittels PCR amplifiziert (Kap. 2.2.1.9). Das so entstandene PCR Produkt wurde dann mit Hilfe einer Gelextraktion aufgereinigt (Kap. 2.2.1.6) und anschließend sequenziert (MWG Biotech).

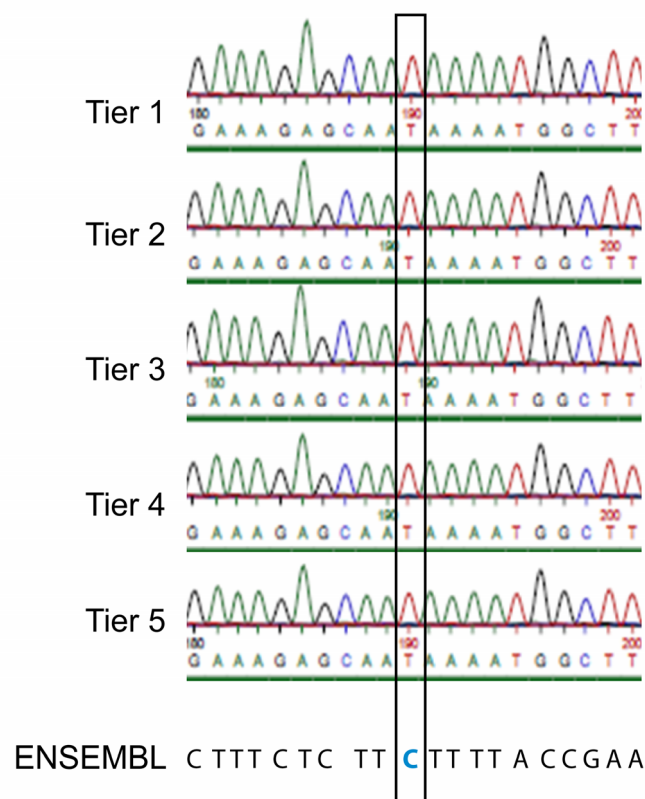


Abbildung 3.1: Sequenzanalyse zur Genotypisierung des verfügbaren Mdx - Stammes. Hier dargestellt sind die Elektropherogramme der Sequenzanalyse der initialen Zuchtpaare des in dieser Arbeit verwendeten Mdx - Stammes. Die mit dem Rahmen markierten Nukleotide zeigen in rot (T) die Mutation der Maus und in blau (C) die Ursprungssequenz des Dystrophins. n= 5.

Der Vergleich der Sequenz des Dystrophins per Ensembl – Algorithmus (www.ENSEMBL.org) mit denen der Amplifikate ergab für alle Tiere eine Übereinstimmung der Nukleotide bis auf den, in der Maus gewünschten, Basenaustausch von C > T an Position 28 des Exon 23 im Dystrophingen auf dem X-

Chromosom (Abb. 3.1). Auf Grundlage dieser Daten konnten nun Verpaarungen der Tiere angesetzt werden, deren Nachkommenschaft ebenfalls homozygot für die Mutation ist und somit kein Dystrophin aufweist.

3.1.1. Bestimmung des genetischen Hintergrundes der Mdx – Maus

Aufgrund der phänotypischen Abweichungen des in dieser Arbeit verwendeten Mdx – Stammes vom Originalstamm (Originalstamm: schwarzes Fell, schwarze Augen im Vergleich zur Mdx - Maus: graues Fell, rote Augen), war es notwendig den genetischen Hintergrund der hier verwendeten Mauslinie zu verifizieren. Dazu wurde eine Schwanzbiopsie eines in dieser Arbeit verwendeten Tieres zur genetischen Hintergrundanalyse an *Jackson Laboratories* (Bar Harbour, Maine, USA) gesandt. Aus den Analysen ergab sich für die Chromosomen 1 - 19 ein anteiliger C57BL/10J - Hintergrund von 74,14%. Das X – Chromosom, welches die phänotypbestimmende Mutation trägt, konnte zu 100% dem einer C57BL/10J – Maus zugeordnet werden.

Daraus lässt sich schließen, dass bei der Zucht des in dieser Arbeit verwendeten Stammes zwar Tiere eines anderen genetischen Hintergrundes (129SVJ) eingekreuzt wurden, jedoch das für den Phänotyp wichtige X – Chromosom von der Durchmischung der Linien nicht betroffen ist. Daher wurde entschieden, mit dem hier vorliegenden Mischstamm C57BL/10ScSn-129SVJ zu arbeiten.

3.2. Phänotypisierung der Mdx – Mauslinie

Aufgrund des abweichenden genetischen Hintergrundes der in dieser Arbeit verwendeten Mdx – Maus (Mdx) von der originalen C57BL/10J(ScSn)-DMD^{mdx}J (*Jackson Laboratories*) erfolgte die Phänotypisierung der hier verwendeten Mdx um die Vergleichbarkeit der beiden Modelle zu bestätigen.

3.2.1. Histopathologische Untersuchungen des Herz- und Skelettmuskel

Da pathologische Veränderungen der Skelett- und Herzmuskulatur maßgeblich die Ausprägung des Phänotyps der Duchenne – Muskeldystrophie – Maus bestimmen, wurden repräsentativ Herz und *M.quadriceps femoris* (M.q.f.) des hier verwendeten Mdx – Stammes (Mdx) und der C57BL/10J – Kontrolle (Kontrolle) untersucht. Um zwischen den verschiedenen, für die C57BL/10J(ScSn)-DMD^{mdx}J beschriebenen, pathologischen Veränderungen, wie variable Muskelzellmorphologie und Muskelfibrose (Bulfield *et al.*, 1984), besser differenzieren zu können wurden zwei

verschiedene Färbungen angewandt. Dabei wurden Hämatoxylin/Eosin (HE) - Färbungen (Kap. 2.2.7.8) vor allem zur Abklärung der morphologischen Gewebeveränderungen und Infiltration des Gewebes durch Zellen des Immunsystems verwendet, die Elastika van Gieson (vG) - Färbung (Kap. 2.2.7.9) hingegen diente vor allem der Darstellung von Fibrose im Gewebes.

Durch den progressiven Verlauf der Muskeldystrophie bei C57BL/10J(ScSn)-DMD^{mdx}J (Bulfield *et al.*, 1984) war es zwingend notwendig, histopathologische Untersuchungen bei verschiedenen Altersklassen der hier verwendeten Mdx – Mäuse vorzunehmen. Dazu wurden Herz und M.q.f. von männlichen Kontroll und Mdx – Tieren im Alter von 8, 16 und 33 Wochen (jeweils n= 3) entnommen, kryokonserviert (Kap. 2.2.7.2) und Ultradünnschnitte (Kap. 2.2.7.3) der einzelnen Gewebe erstellt, welche anschließend gefärbt (s.o.) und lichtmikroskopisch (Eclipse 90i, *Nikon*) ausgewertet wurden.

Bei Betrachtung der HE – Färbungen des Herzens (Abb. 3.2) wird der zuvor erwähnte progressive Verlauf der Muskeldystrophie vor allem zwischen 8 und 16 Wochen alten Mdx – Mäuse deutlich. Während sich bei 8 Wochen alten Tieren im Herzen nahezu kein Granulationsgewebe finden lässt, so zeigen Tiere im Alter von 16 Wochen vor allem im rechten Ventrikel Ansiedlungen von Fibroblasten (Abb. 3.2, Stern), welche bei genauerer Betrachtung in der vG – Färbung vermehrt kollagenes Bindegewebe (Rotfärbung) gebildet haben (Abb. 3.2, Pfeil). Allerdings ist hier anzumerken, dass sich die, durch die Dystrophie begründeten, pathologischen Veränderungen der Tiere im Alter von 16 Wochen sehr heterogen erscheinen. Erst im Alter von 33 Wochen war eine Stabilisierung des Pathologischen Bildes im Herzen der Mdx - Mäuse zu erkennen. Die dabei beobachteten Charakteristika waren vor allem die Reduktion der Fibroblastenzahl und die damit verbundene Zunahme des Bindegewebes in den dystrophen Bereichen des Herzens (Abb. 3.2, Pfeil). Da in diesen Abschnitten des Herzens vermehrt nekrotische Muskelfasern zu finden sind, gekennzeichnet durch fehlende Kerne, kam es vor allem bei den 16 Wochen alten Mdx - Mäusen neben der Einwanderung von Fibroblasten ebenfalls zur Einwanderung eosinophiler bzw. basophiler Granulozyten. Im Gegensatz zur Mdx - Linie konnte bei den Kontroll - Tieren keine vermehrte Ansiedlung von Fibroblasten, Fibrose oder Infiltration des Myokards mit Granulozyten nachgewiesen werden.

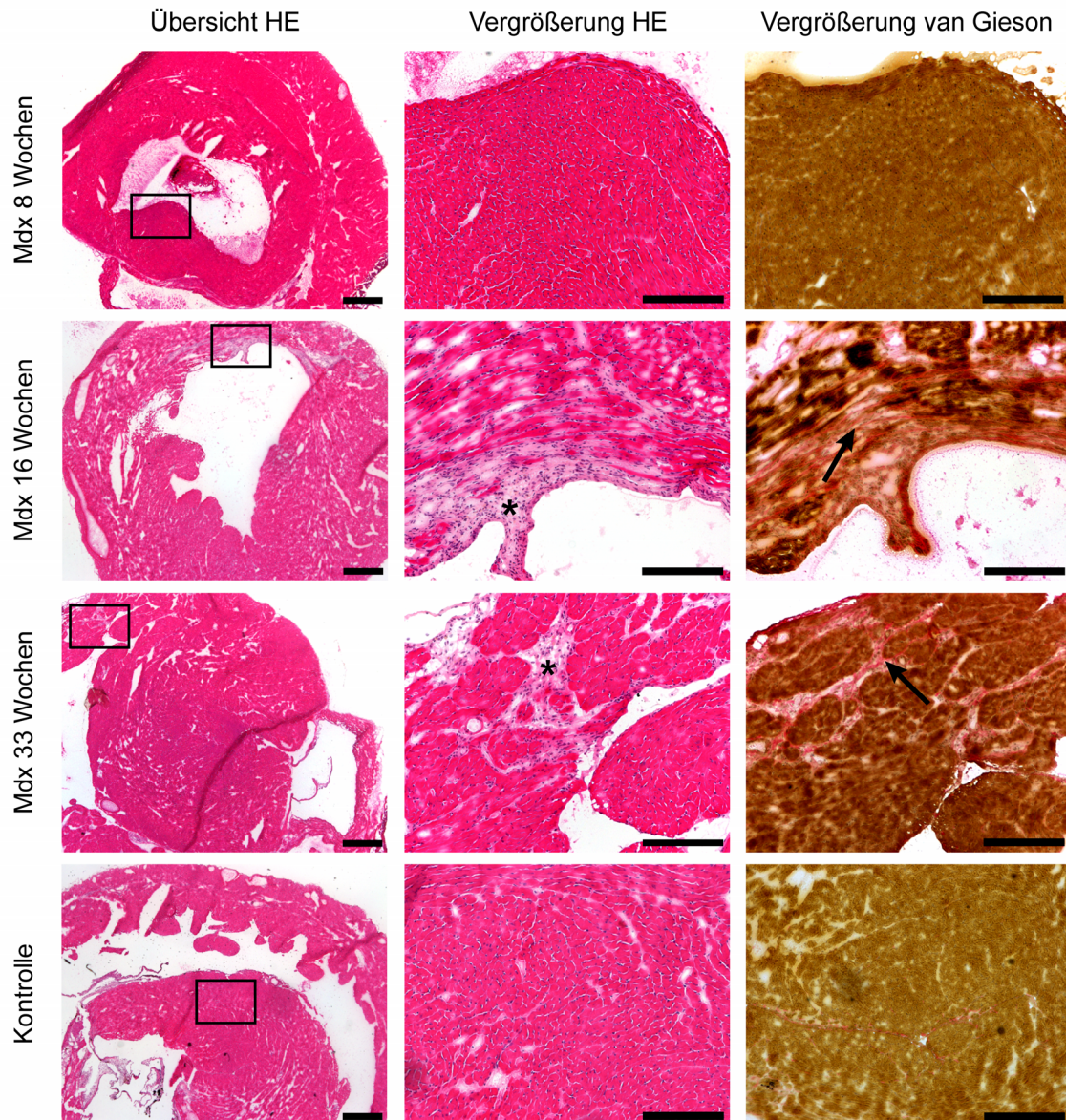


Abbildung 3.2: Histopathologische Untersuchung des Herzmuskels. Dargestellt sind Übersichten der Herzen in HE und Vergrößerungen sowohl in HE als auch in van Gieson von Mdx – Mäusen im Alter von 8 bis 33 Wochen. Zum pathologischen Vergleich diente eine C57BL/10J – Kontrolle. (Balkengröße: Übersicht= 500 µm, Vergrößerung= 50 µm, Stern= Granulationsgewebe, Pfeil= Fibrose)

Analog zum Herzen sind im M.q.f von 8 Wochen alten Mdx keine Nekrosen oder Infiltrationen mit eosinophilen bzw. basophilen Granulozyten und Fibrozyten zu beobachten. Jedoch weisen diese Tiere morphologische Veränderungen hinsichtlich Größe der Muskelzellen und Verschiebung der Kernlage zur Mitte der Muskelzelle auf (Abb. 3.3, Stern).

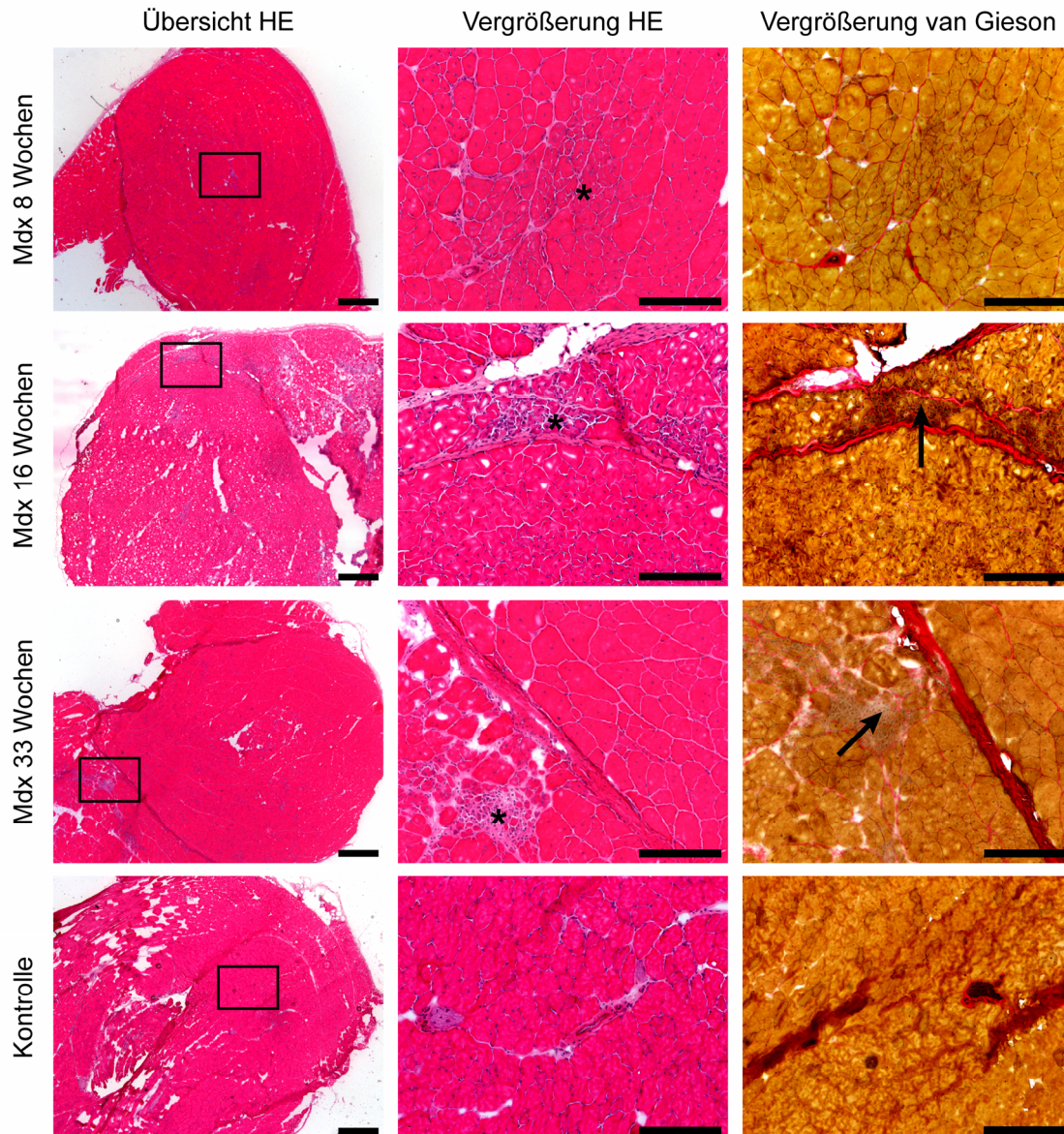


Abbildung 3.3: Histopathologische Untersuchung des *Musculus quadriceps femoris*. Dargestellt sind Übersichten des Muskels in HE und Vergrößerungen sowohl in HE - als auch in van Gieson - Färbung von Mdx – Mäusen im Alter von 8 bis 33 Wochen. Zum Vergleich dienten die C57BL/10J – Kontrollen. (Balkengröße: Übersicht= 500 µm, Vergrößerung= 50 µm, Stern= Granulationsgewebe, Pfeil= Fibrose)

Der progressive Verlauf der Muskeldystrophie ist auch im M.q.f. am stärksten zwischen 8 und 16 Wochen alten Tieren zu beobachten, dabei ist im Gegensatz zu 8 Wochen alten Tieren bei 16 Wochen alten Tieren deutlich das Granulationsgewebe mit beginnender Fibrose zu erkennen (Abb. 3.3, Stern, Pfeil). Allerdings ist beim M.q.f. zu vermerken, dass sich das pathologische Bild der Muskeldystrophie selbst bei 33 Wochen alten Tieren als äußerst heterogen herausstellt. Trotz der individuellen Ausprägung des Phänotyps der Muskeldystrophie im M.q.f. können

nekrotische Muskelzellen, Infiltrationen von Fibrozyten und Granulozyten, sowie erhöhte Fibrose des Gewebes bei 33 Wochen alten Mdx - Tieren beobachtet werden (Abb. 3.3, Stern, Pfeil). Die Kontrolle hingegen zeigt keinerlei Anzeichen eines pathologischen Bildes einer Muskeldystrophie.

Somit weist der in dieser Arbeit verwendete Mdx – Mausstamm die notwendigen pathologischen Veränderungen im Herz – und Skelettmuskel auf, die hinsichtlich eines Erfolges therapeutischer Ansätze validiert werden müssen.

3.2.2. Erhebung des Immunstatus im Herz- und Skelettmuskel

Um einen viralen Gentransfer in Mdx – Mäuse zu ermöglichen, dessen Erfolg zum Großteil durch immunologische Interferenz mit dem Wirt bestimmt wird, sollte im Vorfeld geklärt werden, ob es durch die Nekrosen in Herz – und Skelettmuskel zu einer zusätzlichen Infiltration des Gewebes mit $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ - T – Zellen und Makrophagen kam. In diesem Zusammenhang folgte neben der bereits abgeschlossenen histopathologischen (Kap. 3.2.1) auch die immunologische Untersuchung. Dazu wurden kryokonservierte Ultradünnschnitte (Kap. 2.2.7.3) von Herz – und Skelettmuskel angefertigt und die entsprechenden Zielzellen zum einen durch chemische Immunodetektion (Kap. 2.2.7.7) mit biotinylierten CD4/CD8 - Antikörpern (*BD Bioscience*) und zum anderen durch Fluoreszenzimmunodetektion mit biotinyliertem CD11b Antikörper (*Southern Biotech*) detektiert. In den Durchlichtmikroskopieuntersuchungen der chemisch immunodetektierten Gewebe konnte, im Vergleich zur Positivfärbung der Milz (Abb. 3.4, Pfeil), weder bei Mdx – Tieren im Alter von 8, 16 und 33 Wochen, noch für die Kontrolle eine Infiltration des Myokards mit $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ - T –Zellen beobachtet werden. Ebenfalls negativ auf Makrophagen waren die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen des Myokards sowohl in Mdx - Mäusen aller untersuchten Altersstufen, als auch, der Kontrollen.

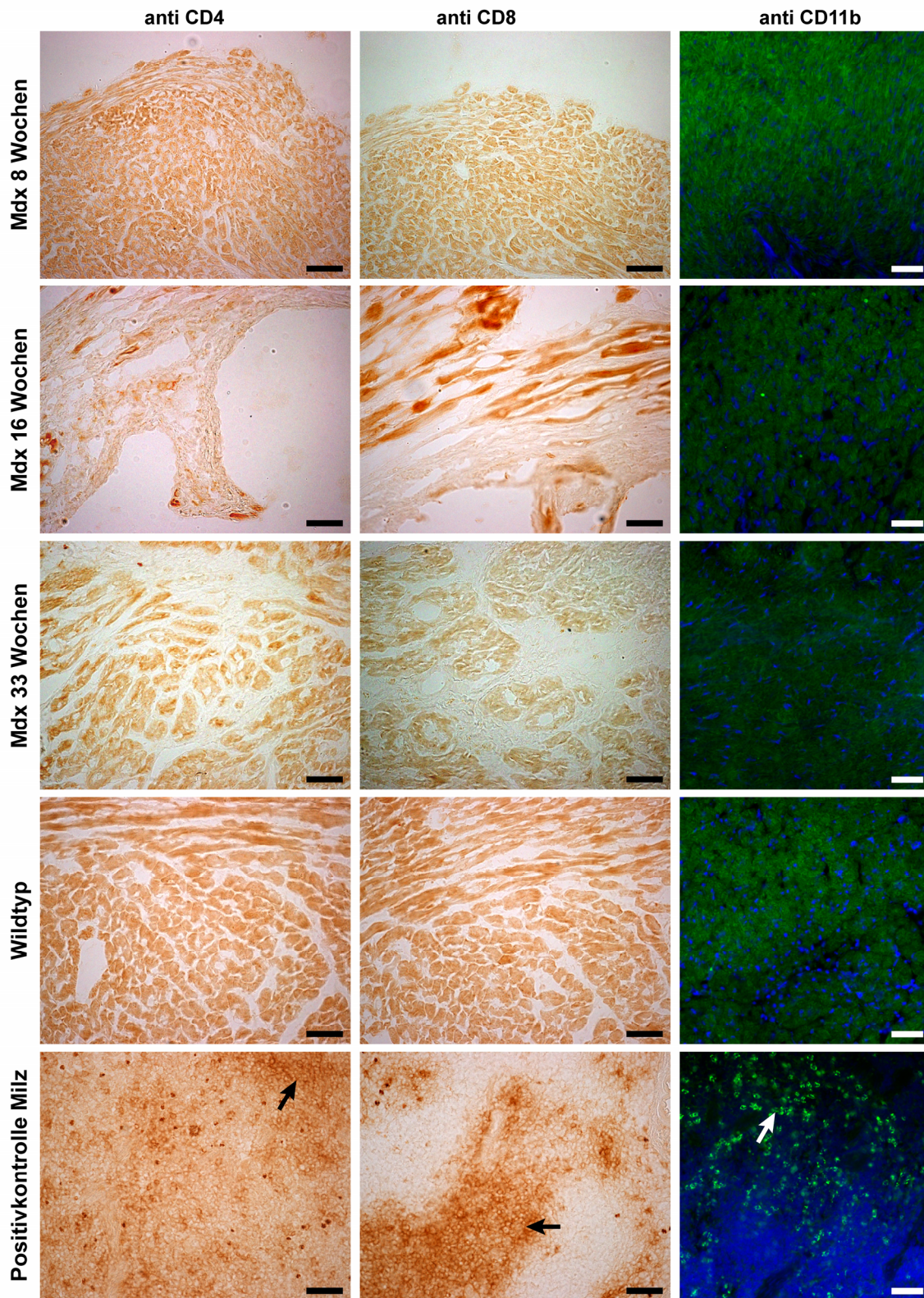


Abbildung 3.4: Untersuchung des Herzmuskels auf Inflammation. Dargestellt sind Vergrößerungen transversaler Gewebeschnitte des Myokards von Mdx – Mäusen im Alter von 8 bis 33 Wochen nach Färbung von CD4, CD8 und CD11b. Als Negativkontrolle diente das Herz einer C57BL/10J – Kontrolle, als Positivkontrolle deren Milz. (Balken= 50 µm, Pfeile= positive Färbung)

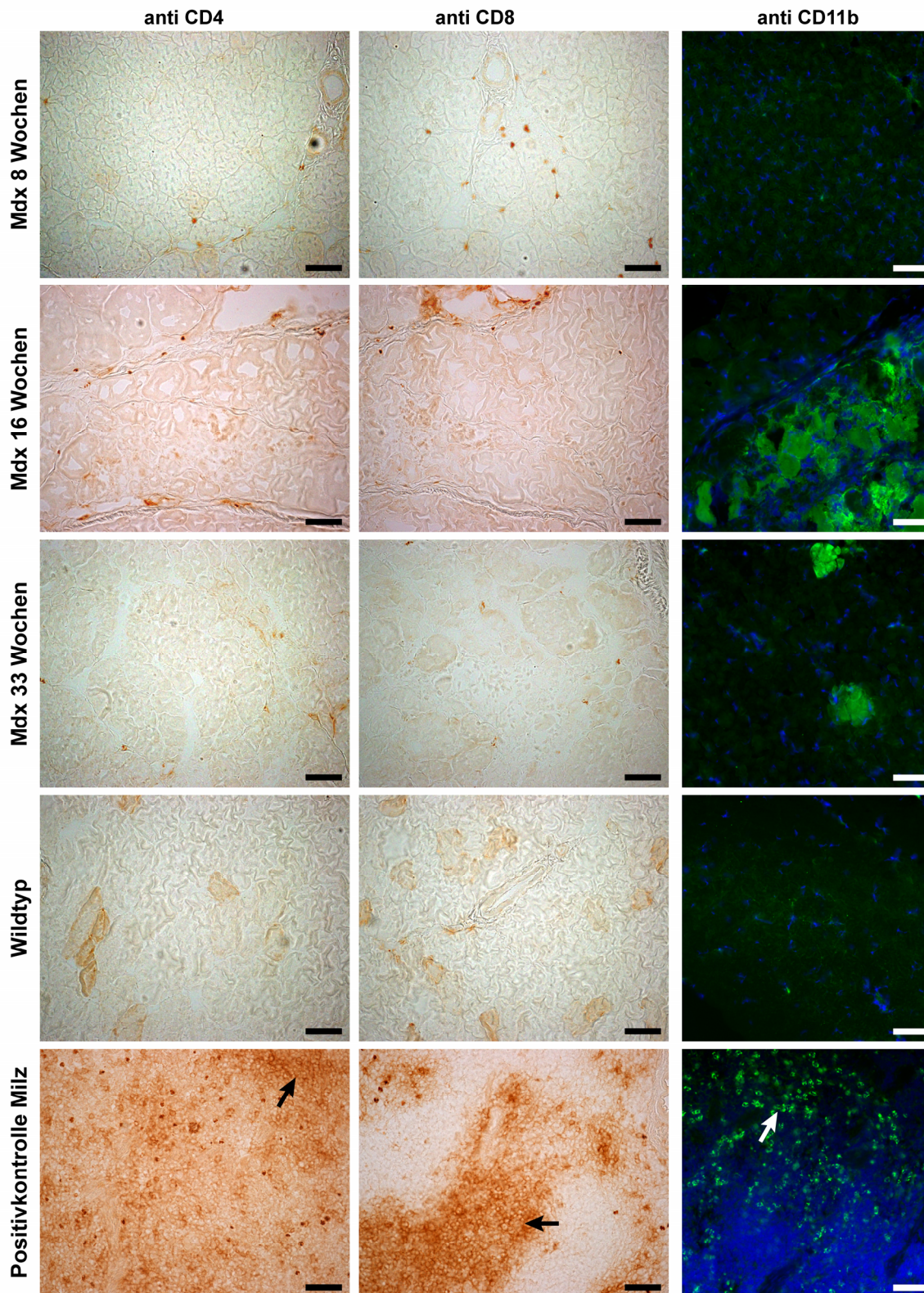


Abbildung 3.5: Untersuchung *Musculus quadriceps femoris* auf Inflammation. Dargestellt sind Vergrößerungen transversaler Gewebeschnitte des Muskels von Mdx – Mäusen im Alter von 8 bis 33 Wochen nach Färbung von CD4, CD8 und CD11b. Als Negativkontrolle diente der Muskel einer C57BL/10J – Kontrolle, als Positivkontrolle deren Milz. (Balken= 50 µm, Pfeile= positive Färbung)

Analog zum Herzen konnte auch im M.q.f. keine vermehrte Infiltration von $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ - T – Zellen und Makrophagen nachgewiesen werden Befund (Abb. 3.5). Allein die nekrotischen Muskelfasern erzeugten eine Fluoreszenz was aber im Vergleich mit der Positivkontrolle Milz als unspezifische Interaktion mit dem Makrophagenantikörper erklärt werden kann (Abb. 3.5, Pfeile). Durch die Abwesenheit von $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ - T – Zellen und Makrophagen in Herz – und Skelettmuskel des hier verwendeten Mdx – Stammes sind die Voraussetzungen für eine virale Therapie der Mdx - Maus gegeben.

3.2.3. Bestimmung relevanter Blutparameter

Da die Dystrophie der DMD^{mdx} – Maus (Mdx) nicht auf die Skelettmuskulatur beschränkt ist, sondern auch das Herz betrifft, sollte eine Diagnostik der myokardialen Beteiligung etabliert werden. Dazu wurden die aus dem Blut bestimmbaren Parameter Kreatinkinase und Troponin T gewählt, welche entweder bei Schädigung der Muskulatur oder des Myokards vermehrt in den Blutkreislauf gelangen (Kap. 2.2.5.3). Dabei wurde eine deutliche Erhöhung des Kreatinkinasegehaltes um das 5 fache im Blut von Mdx – Mäusen gegenüber der als Kontrolle verwendeten C57BL/10J bereits im Alter von 10 Wochen (4.296 ± 431 vs. 869 ± 286 ; $p=0,007$, $n=5$) ersichtlich (Abb. 3.6). Auch im fortgeschrittenen Alter von 40 Wochen konnte zwischen Mdx - Tieren und Kontrolle ein 5 facher Unterschied im Kreatinkinasegehalt des Blutes festgestellt werden (1.585 ± 170 vs. 387 ± 148 ; $p=0,001$, $n=5$). Da sich die Muskeldystrophie bei Mdx – Mäusen erst nach 8 - 10 Wochen in vollem Umfang auszubilden beginnt und das Ausmaß der Muskelschädigung individuell verschieden sein kann, zeigen die Mdx - Mäuse im mittleren Alter von 20 Wochen eine variable Konzentration von Kreatinkinase im Blut (6.647 ± 3.078 Einheiten/Liter). Trotz der hohen Varianz der Messwerte war es möglich einen signifikanten Unterschied zwischen Mdx – Mäusen und Kontrolle im Alter von 20 Wochen nachzuweisen (6.647 ± 1.539 vs. 408 ± 179 ; $p=0,026$, jeweils $n=5$ bzw. 4).

Im Gegensatz zur Kreatinkinase war keine signifikante Veränderung des kardialen Troponin T sowohl zwischen Mdx:Mdx, als auch Mdx:Kontrollen in den verwendeten Altersklassen nachweisbar (Abb. 3.6). Allerdings ist auch hier eine erhöhte Varianz der Daten bei Mdx – Mäusen ($17,42 \pm 8,70$ $\mu\text{g/Liter}$) gegenüber der Kontrolle ($5,58 \pm 2,60$ $\mu\text{g/Liter}$) zu beobachten ($p=0,220$, jeweils $n=5$ bzw. 4). Aufgrund der, je nach

Altersstufe der Mdx - Mäuse, breit gestreuten Ergebnisse der Troponin T – Bestimmung, dient dieser Parameter nur bedingt der Diagnostik einer Herzinsuffizienz bei Mdx - Mäusen.

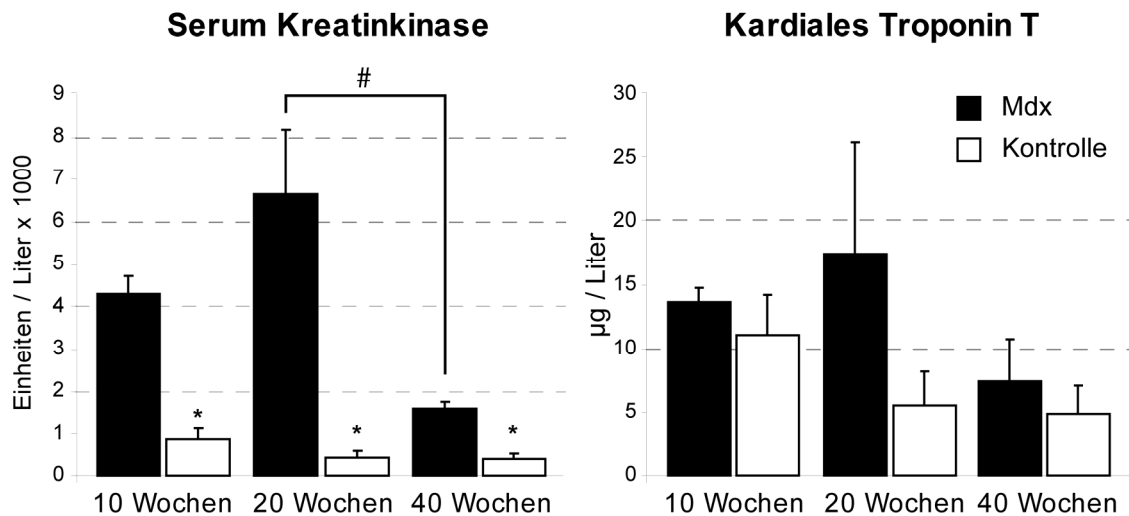


Abbildung 3.6: Quantifizierung von Blutparametern. Als Indikator einer Skelettmuskel – und Myokardschädigung wurde der Gehalt von Kreatinkinase und kardialen Troponin T in Blutproben von Mdx - Mäusen und C57BL/10J – Kontrollen unterschiedlichen Alters bestimmt. Alle Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ bei Mdx:Kontrolltier; # $p < 0,05$ bei Mdx(40Wochen):Mdx(20 Wochen).

3.2.4. Kardiale Funktionsparameter

Durch frühere Arbeiten (Quinlan *et al.*, 2004) ist bekannt, dass DMD^{mdx} (Mdx) – Mäuse zwar pathologische Veränderungen im Herzen aufweisen, diese sich funktionell erst ab einem Alter von 42 Wochen über Echokardiographie nachweisen lassen. Um diese Aussage auch für den hier verwendeten Mischstamm zu bestätigen, wurden Mdx - Mäuse im Alter von 8, 16, 33 und 65 Wochen (jeweils $n = 5$) mit C57BL/10J – Kontrollen (jeweils $n = 5$) von PD Dr. Raffi Bekeredjian mittels transthorakaler Echokardiographie hinsichtlich einer funktionellen Veränderung des linken Ventrikels untersucht (Kap. 2.2.5.4). Dabei lag die fraktionelle Verkürzung des linken Ventrikels aller untersuchten Tiere bei durchschnittlich $77,73\% \pm 2,23\%$. Somit lässt sich bei der hier verwendeten Linie trotz histopathologischer Veränderungen (Kap. 3.2.1) keine funktionelle Einschränkung mittels transthorakaler Echokardiographie am Herzen nachweisen.

3.3. Systemischer Gentransfer in das Mausherz

3.3.1. Potential der transkriptionellen Steuerung für AAV9

Wie aus einer vorangegangenen Arbeit dieser Arbeitsgruppe bekannt ist (Müller *et al.*, 2006), führt im Falle von AAV2(R484E;R585E) die Kombination aus transduktioneller und transkriptioneller Zielrichtung, unter Verwendung des kardial spezifischen CMV verstärkten Myosin-Leichtketten-1.5kb – Promotors (CMV-MLC1.5kb) (Kap. 2.1.3.1.) zu einem erhöhten kardialen Gentransfer. Um das volle Potential transkriptioneller Steuerung hinsichtlich verbesserter kardialer Genexpression zu testen, wurden adulte NMRI – Mäuse mit 1×10^{11} viralen Genomen (Kap. 2.2.3.1 bis 2.2.3.3) des für den Herzmuskel effizienteren AAV – Serotypen 9 intravenös injiziert (Kap. 2.2.5.1). Die Kontrolle der Expression des Luziferasereportergens erfolgte zum einen über den unspezifischen CMV - Promotor (n= 11) und zum anderen über den kardial spezifischen CMV-MLC1.5kb – Promotor (n= 9). Dabei konnte im Vergleich des CMV-MLC1.5kb – Promotors mit dem CMV – Promotor vier Wochen nach Injektion der Tiere, eine 235 fache Erhöhung der Luziferaseaktivität (Kap. 2.2.4.4) im linken Ventrikel ($3,8 \times 10^8 \pm 1,5 \times 10^8$ vs. $1,6 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^5$; p= 0,047) und eine 408 fache Erhöhung im rechten Ventrikel ($4,3 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^8$ vs. $1,0 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^5$; p= 0,034) zugunsten des kardial spezifischen CMV-MLC1.5kb verzeichnet werden (Abb. 3.7). Allerdings kam es zusätzlich zu einer unspezifischen 42 fachen Erhöhung der Luziferaseaktivität in der Milz ($7,7 \times 10^4 \pm 3,2 \times 10^4$ vs. $1,8 \times 10^3 \pm 0,5 \times 10^3$; p= 0,049) und einer 65 fachen im *Musculus quadriceps femoris* ($3,0 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$ vs. $4,6 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$; p= 0,029) mit dem CMV-MLC1.5kb - Konstrukt. Daraus lässt sich schließen, dass die transkriptionelle Steuerung in AAV9-CMV-MLC1.5kb-Luc, im Vergleich zu AAV9-CMV-Luc, zu einer signifikant erhöhten kardialen Reportergenexpression führt.

Spezifität des MLC-Promotors

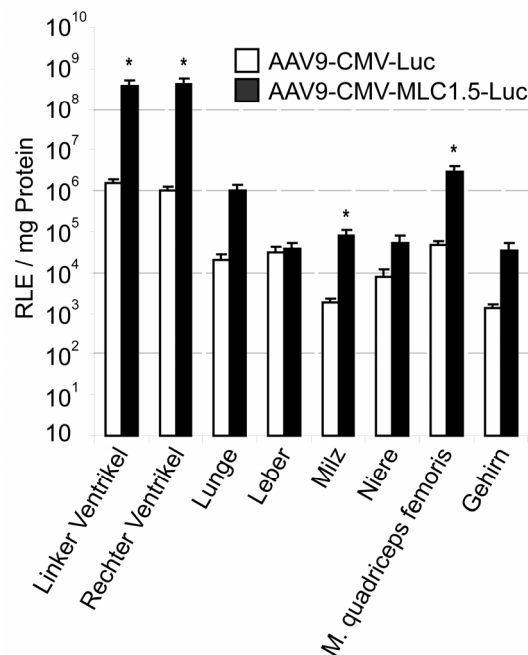


Abbildung 3.7: Transduktionseffizienz von AAV9-CMV-Luc und AAV9-MLC1.5kb-Luc. Die Luziferaseaktivität [relative Lichteinheiten (RLE) pro mg Protein] wurde 4 Wochen nach systemischer Gabe von 1×10^{11} viralen Genomen bestimmt. Alle Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, * $p \leq 0,05$, (jeweils $n = 11$ bzw. 9)

3.3.2. Vergleich transduktionell und transkriptionell zielgerichteter AAV – Vektoren

Die transduktionelle Zielrichtung, bezogen auf den natürlichen Tropismus verschiedener AAV – Serotypen, stellt einen wichtigen Aspekt für den spezifischen Gentransfer in ein bestimmtes Gewebe dar (Zincarelli *et al.*, 2008). Zudem konnte bereits eine Kombination aus transduktioneller und transkriptioneller Zielrichtung die Spezifität der Transduktion für ein bestimmtes Gewebe erhöhen (Müller *et al.*, 2006). Um dies auch für AAV9 – Vektoren zu bestätigen, wurden die Transduktionseffizienzen, in Form von Luziferaseaktivität (Kap. 2.2.4.4), des AAV9 ($n = 9$) und AAV2(R484E;R585E) (ddAAV2) ($n = 12$) in Kombination mit dem CMV verstärkten MLC1.5kb – Promotor, vier Wochen nach Injektion 1×10^{11} viraler Genome (Kap. 2.2.3.1 bis 2.2.3.3), miteinander verglichen (Abb. 3.8). Dabei konnte eine 1.392 fache ($4,3 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^8$ vs. $3 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$; $p = 0,034$) Erhöhung der Luziferase im Herzen für AAV9 im Vergleich zu ddAAV2 festgestellt werden. Allerdings wurde bei Verwendung des AAV9-CMV-MLC1.5kb im Gegensatz zu ddAAV2-CMV-MLC1.5kb eine signifikante Reporterogenaktivität in der Leber

($3,9 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^4$ vs. $0,0 \pm 0,0$; $p = 0,013$), in der Milz ($7,7 \times 10^4 \pm 3,2 \times 10^4$ vs. $0,0 \pm 0,0$; $p = 0,045$) und im *Musculus quadriceps femoris* ($3,0 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$ vs. $0,0 \pm 0,0$; $p = 0,027$) beobachtet. Trotz der erhöhten unspezifischen Transduktion in nichtkardialen Geweben, konnte durch die Kombination aus transkriptioneller und transduktioneller Zielrichtung mit AAV9 ein deutlicher Fortschritt hinsichtlich kardialer Spezifität gegenüber AAV2(R484E;R585E) erreicht werden.

Vergleich von AAV9 mit AAV2(R484E;R585E)

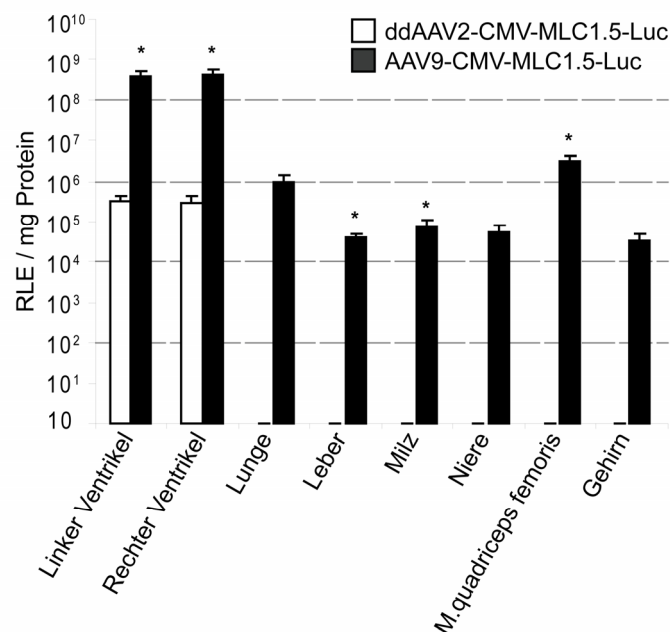


Abbildung 3.8: Reporter-genexpressionsprofile der Serotypen AAV2(R484E;R585E) (n= 12) und AAV9 (n= 9), in Kombination mit dem kardial spezifischen CMV verstärkten MLC1.5kb Promotor in adulten NMRI Mäusen. Die Luziferaseaktivität [relative Lichteinheiten (RLE) pro mg Protein] wurde 4 Wochen nach systemischer Gabe von 1×10^{11} viralen Genomen bestimmt. Alle Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, * $p \leq 0,05$

3.3.3. Reduktion der MLC – Promotorsequenz

Wie bereits beschrieben (Kap. 3.3.1) führt die Kombination aus CMV verstärktem MLC1.5kb – Promotor und AAV2(R484E; R585E) bzw. AAV9 zu einer erhöhten Spezifität und Effektivität der Reporter-genexpression im Herzen. Da durch das natürliche Verpackungs-limit von AAV – Vektoren ($\approx 4,8$ kb) und die Größe der Promotoren das Platzangebot für Reporter – bzw. Transgene limitiert ist, wurde die Effizienz und Spezifität einer auf 260 bp verkürzten Version des MLC1.5kb – Promotors im Vergleich zum MLC1.5kb getestet. Beide CMV verstärkten MLC –

Promotorfragmente wurden, mit Luziferase als Reportergen, in AAV2(R484E;R585E) (ddAAV2) verpackt. Die Injektion von 1×10^{11} viralen Genomen in adulte NMRI – Mäuse (Kap. 2.2.3.1 bis 2.2.3.3) erfolgte anschließend über die Schwanzvene.

Wie in Abbildung 3.9 zu erkennen ist, konnte weder im linken oder rechten Ventrikel, noch in der Leber zwischen den Vektoren ddAAV2-CMV-MLC1.5kb (n= 12) und ddAAV2-CMV-MLC0.26kb (n= 6) ein Unterschied hinsichtlich der Reportergenexpression beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte bei Verwendung des CMV-MLC0.26kb – Promotors im Vergleich zum CMV-MLC1.5kb – Promotor eine Luziferaseaktivität im *Musculus quadriceps femoris* ($9,9 \times 10^4 \pm 1,9 \times 10^4$ vs. $0,0 \pm 0,0$; $p = 0,000$) verzeichnet werden. Dies demonstriert, dass eine weitere Verkürzung der regulatorischen Sequenz des CMV-MLC1.5kb – Promotors zwar zu einer erhöhten Unspezifität des Tropismus führt, hingegen die kardiale Reportergenexpression nicht beeinflusst wird. Dadurch können Vektoren hergestellt werden, die aufgrund der geringen Größe des Promotors mehr Platz für größere Transgene zur Verfügung stellen.

Spezifität unterschiedlicher MLC-Fragmente

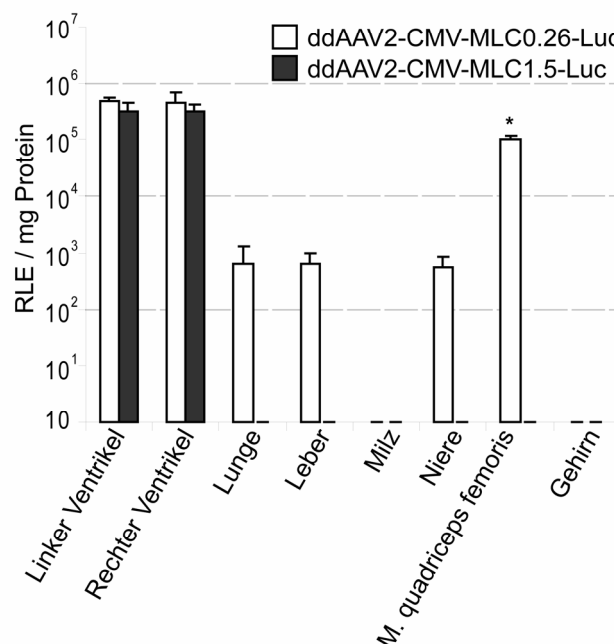


Abbildung 3.9: Abhängigkeit der Reportergenaktivität von MLC-Promotoren mit unterschiedlich langen regulatorischen Sequenzen. Die Luziferaseaktivität [relative Lichteinheiten (RLE) pro mg Protein] in CMV-MLC0.26kb (n= 6) und CMV-MLC1.5kb (n= 12) wurde 4 Wochen p.i. nach Gabe von 1×10^{11} viralen Genomen bestimmt. Alle Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, * $p \leq 0,05$

3.3.4. EGFP – Reportervektoren zur Lokalisation der Genexpression in transversalen Hermuskelschnitten

Voraussetzung der fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der kardialen Transduktionseffizienz mittels Kombination von CMV-MLC0.26kb – Promotor und AAV9, war die Herstellung eines EGFP – Reportergenkonstruktes. Dazu wurde der CMV – Promotor des pdsAAV-CMV-EGFP (Wang *et al.*, 2003) durch den oben beschriebenen CMV verstärkten MLC0.26kb – Promotor (MluI/HindIII – Fragment) ersetzt (Kap. 2.2.1.10), wodurch das dsAAV-CMV_{enh}-MLC0.26kb-EGFP entstand. Um die räumliche Verteilung der Reportergenaktivität innerhalb des Myokards zu vergleichen, wurden sowohl das CMV-EGFP - Konstrukt als auch das CMV-MLC0.26-EGFP - Konstrukt in AAV9 verpackt (Kap. 2.2.3.1 bis 2.2.3.3). Anschließend erfolgte die Injektion adulter NMRI Mäuse mit 1×10^{11} (n= 3) bzw. 1×10^{12} (n= 2) viralen Genomen (vG) über die Schwanzvene. Zur Validierung der Reportergenaktivität wurden die Organe der Mäuse vier Wochen nach Infektion entnommen (Kap. 2.2.5.2) und kryoprotektiv konserviert (Kap. 2.2.7.2). Nach Erstellung von Ultradünnschnittpräparaten (Kap. 2.2.7.3) erfolgte die Analyse der Reportergenaktivität per Fluoreszenzmikroskopie. In den transversalen Übersichtsbildern des Herzens (Abb. 3.10) ist deutlich eine transmurale Expression sowohl für die Kombination CMV-EGFP als auch für CMV-MLC0.26-EGFP bei beiden Vektorkonzentrationen (1×10^{11} und 1×10^{12} vG) zu erkennen. Ein Unterschied in der Transduktionseffizienz zwischen beiden Kombinationen wird erst deutlich, wenn die Anzahl EGFP – positiver Kardiomyozyten in Relation zur Gesamtzahl der mit Aktin gefärbten Kardiomyozyten (Kap. 2.2.7.6) gesetzt wird. Dabei liegt die Transduktionseffizienz bereits bei applizierter Vektordosis von 1×10^{11} vG der Kombination CMV-MLC0.26-EGFP bei 51% aller Kardiomyozyten, die der Kombination CMV-EGFP bei 40% der Kardiomyozyten. Somit kann mit dem CMV-MLC0.26kb regulierten AAV9 – Vektor die Reportergenexpression im Herzen erhöht und eine transmurale Verteilung des Reportergens im Myokard erreicht werden.

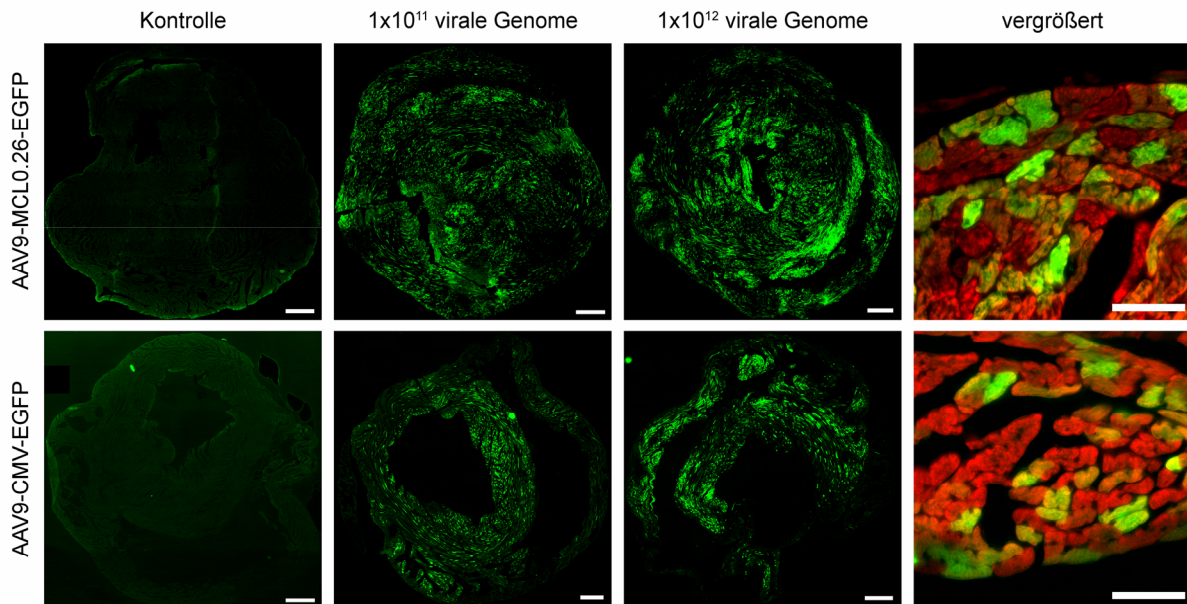


Abbildung 3.10: Untersuchung der Lokalisation einer kardialen Fluoreszenz - Reporterexpression. Dargestellt ist die räumliche Verteilung von EGFP (grün) in Herzen von AAV9-CMV-EGFP oder AAV9-MLC0.26kb-EGFP injizierten Mäusen bei Vektorkonzentrationen von 1×10^{11} und 1×10^{12} viralen Genomen. Gezeigt werden zum einen transversale Übersichtsbilder des Herzens, nur EGFP-Fluoreszenz (grün, Balken= 500 μm), zum anderen transversale Vergrößerungen, mit einer Kombination aus EGFP-Fluoreszenz (grün) mit einer Aktinfärbung (Phalloidin= rot, Balken= 50 μm).

3.3.5. Einfluss von Vektordosis und Promotor auf die Lebertransduktion

Um die Spezifität der Kombination AAV9 und CMV-MLC – Promotor zu testen, wurden die mit AAV9-CMV-MLC0.26kb-EGFP bzw. AAV9-CMV-EGFP injizierten Mäuse (Kap. 3.3.4) hinsichtlich EGFP - Reporterexpression in der Leber untersucht. Dazu wurden Dünnschnittpräparate (Kap. 2.2.7.3) von zuvor kryokonservierten Leberproben (Kap. 2.2.7.2) mittels Fluoreszenzmikroskopie auf EGFP – Expression hin untersucht (Abb. 3.11). Bei vergleichender Analyse der Leberdünnschnitte von AAV9-CMV-MLC0.26kb-EGFP und AAV9-CMV-EGFP, zeigte sich für AAV9-CMV-MLC0.26kb-EGFP eine geringe, in 12% aller Hepatozyten zu detektierende Reporterexpression erst bei einer Konzentration von 1×10^{12} viralen Genomen (vG). Im Gegensatz dazu, konnte für AAV9-CMV-EGFP eine Reporterexpression in 6% der Hepatozyten bereits bei einer Vektorkonzentration von 1×10^{11} vG verzeichnet werden, welche bei Erhöhung der Vektordosis (1×10^{12} vG) ebenfalls zunahm und zu einer Reporterexpression in 56% der Hepatozyten führte. Die Gewebespezifität der Expression ist somit nicht nur vom Promotor, sondern auch von der verwendeten Vektordosis abhängig.

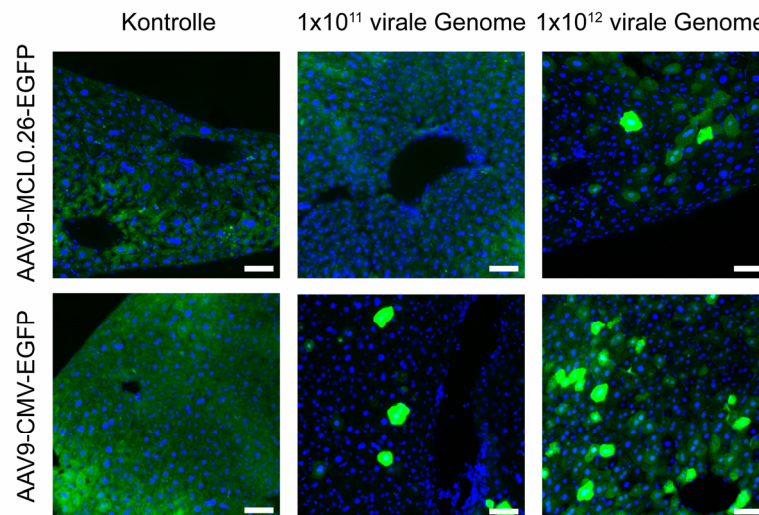


Abbildung 3.11: Expression von EGFP (grün), kombiniert mit DAPI - Kernfärbung (blau) in transversalen Leberschnitten von adulten NMRI Mäusen. Diese wurden zuvor mit AAV9-CMV-EGFP oder AAV9-CMV-MLC0.26kb-EGFP in Konzentrationen von 1×10^{11} bzw. 1×10^{12} viralen Genomen injiziert. Balken= 50µm.

3.4. Ultraschall vermittelter kardialer Gentransfer von AAV – Vektoren in Ratten

Ziel von Untersuchungen zum Gentransfer im Tiermodell ist die spätere Übertragung des Therapieansatzes auf Patienten. Da eine intravenöse Applikation der Vektorlösung aufgrund der starken Verdünnung oder einer möglichen Induktion einer Immunantwort bei zu hoher Viruslast schwer umsetzbar ist, müssen spezifischere Applikationsmethoden für größere Organismen entwickelt werden. In diesem Zusammenhang wird im weiteren Verlauf die Etablierung eines ultraschallgestützten viralen Gentransfers mit Adeno-assoziierten Viren (AAV) beschrieben.

3.4.1. Bindung der AAV – Vektoren an die Oberfläche von Mikrosphären

Der Ultraschall vermittelte Gentransfer von AAV in Herzmuskelgewebe basiert auf dem Prinzip, dass gasgefüllte und mit AAV beladene Mikrosphären (*microbubbles* = MB) durch einen hochfrequenten Ultraschall im Herzen zum Platzen gebracht werden (Kap. 1.3.2.1.). Die daraus resultierenden Druckwellen führen wiederum zu sekundären Effekten, welche eine erhöhte Transduktion der Viren ins Myokard erlauben (Kap. 1.3.2.1.). Da die hier zur Herstellung der Mikrosphären verwendeten Lipidkomponenten (Kap. 2.2.3.4) eine anionische Oberfläche ergeben und die AAV - Kapside kationisch sind, sollte eine Bindung der AAV an die Oberfläche der MB möglich sein. Um den erforderlichen Nachweis dafür zu erbringen, wurde die mit

AAV2 vermischte Lösung aus MB mittels Immunfluoreszenz auf eine Kolokalisation der AAV2 – Partikel mit den MB untersucht (Kap. 2.2.3.4).

Während in Kontrollexperimenten (MB ohne AAV2) keine Fluoreszenz nachweisbar war, zeigte das Fluoreszenzsignal in der Mischung aus AAV2 und MB eine Kolokalisation der AAV mit der Oberfläche der MB (Abb. 3.12), was eine Bindung der AAV an die Oberfläche der Mikrosphären bestätigt.

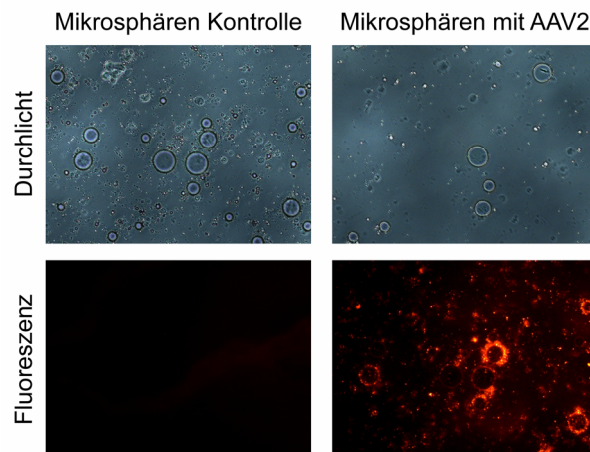


Abbildung 3.12: Kolokalisation von AAV2 mit Mikrosphären. Dargestellt sind sowohl die Kontrolle, Mikrosphären ohne AAV2, als auch die mit AAV2 beladenen Mikrosphären. Während die obere Reihe die Mikrosphären mittels Durchlichtmikroskopie darstellt, zeigt die untere Reihe die Detektion der AAV in der Fluoreszenzmikroskopie (rot).

Da die Effektivität des Gentransfers und eventuelle Komplikationen (Lungenembolie) von der Größe und Anzahl der Mikrosphären abhängen, wurde getestet, ob das Virus bei Anlagerung an die Mikrosphären einen Einfluss auf deren Charakteristik nimmt. Dazu wurden sowohl mit Virus beladene als auch unbeladene Mikrosphären mit dem Multiziser 3 (*Beckman-Coulter*) hinsichtlich ihrer Größe und Anzahl untersucht (durchgeführt von Dr. Raffi Bekeredjian). Wie aus Tabelle 3.2 hervorgeht, konnten keine signifikante Veränderung hinsichtlich der untersuchten Parameter nach Beladung von Mikrosphären mit AAV - Vektoren festgestellt werden.

	Größe Mikrosphären	Anzahl Mikrosphären
Mikrosphären ohne AAV2	$2.01 \pm 1.9 \mu\text{m}$	$1.39 \pm 0.2 \times 10^9/\text{ml}$
Mikrosphären mit AAV2	$2.19 \pm 2.0 \mu\text{m}$	$1.41 \pm 0.3 \times 10^9/\text{ml}$

Tabelle 3.1: Einfluss der Beladung von Mikrosphären mit AAV2. Dargestellt sind hier die Mittelwerte der mit dem Multiziser 3 (*Beckman-Coulter*) vermessenen Parameter (Größe und Anzahl der Mikrosphären).

3.4.2. Evaluation der Gentransfereffizienz nach AAV – Mikrosphären – Applikation

Um den Einfluss eines Ultraschall gestützten viralen Gentransfers mit Adeno-assoziierten viralen Vektoren (AAV) zu untersuchen, wurden 200-250 g schwere Sprague-Dawley-Ratten anästhesiert und rekombinante AAV6 - bzw. AAV9 Vektoren mit CMV-MLC1.5kb-Luziferase – Genom (4×10^{10} virale Genome), in Kombination mit oder ohne Mikrosphären unter konstantem transthorakalen Ultraschall über die rechte *Vena jugularis* in das Tier infundiert (Kap. 2.2.6.1). Vier Wochen nach Infektion erfolgte die Dissektion verschiedener Organe und die Bestimmung der Luziferaseaktivitäten (Kap. 2.2.4.4). Da bei diesem Versuch, die Effizienz der Transduktion durch Kombination von Mikrosphären und AAV mit der Effizienz der Transduktion mit AAV ohne Mikrobubbles verglichen werden sollte, wurden in diesem Abschnitt die AAV – Serotypen 6 und 9 separat betrachtet.

Im direkten Vergleich (Abb. 3.13 linke Seite), zeigt sich für AAV6 (n= 5) im linken Ventrikel eine signifikante 6 fach erhöhte Luziferaseaktivität der Kombination Mikrosphären:AAV6 gegenüber der Kontrollgruppe ohne Mikrosphären ($1,5 \times 10^5 \pm 7,6 \times 10^4$ vs. $2,4 \times 10^4 \pm 2,4 \times 10^4$, p= 0,02). Der rechte Ventrikel zeigte zwar keinen signifikanten Unterschied in der Reportergenexpression, jedoch ist ein Trend zu Gunsten erhöhter Reportergenaktivität nach Applikation der Viruslösung mit Mikrosphären zu erkennen ($1,0 \times 10^5 \pm 7,8 \times 10^4$ vs. $1,8 \times 10^4 \pm 2,4 \times 10^4$, p= 0,21). Analog zum rechten Ventrikel konnten ähnliche Resultate auch im Atrium beobachtet werden (4681 ± 3897 vs. 1406 ± 3146 , p= 0.18). Im Gegensatz zum Herzen konnte in der Leber zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Luziferaseaktivität im Gewebe festgestellt werden. Interessant in diesem Zusammenhang ist die gleichstarke Effizienz der Lebertransduktion bei beiden Gruppen.

Analog zu AAV6 führte die Kombination aus AAV9:Mikrosphären (n= 4) ebenfalls zu einer signifikant erhöhten Transduktion (23 fach) des linken Ventrikels gegenüber AAV9:ohne Mikrosphären ($3,2 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^5$ vs. $1,3 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^4$, p= 0,05) (Abb. 3.13, rechte Seite). Auch der für AAV6 beschriebene, wenn auch nicht signifikante Trend der Reportergenaktivität zu Gunsten der Kombination Virus:Mikrosphären konnte ebenfalls für AAV9 im rechten Ventrikel ($5,2 \times 10^4 \pm 4,2 \times 10^4$ vs. 7683 ± 4570 , p= 0,12) und im Atrium ($1,8 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^4$ vs. $9.070 \pm 1,3 \times 10^4$, p= 0,49) beobachtet werden. Analog zu AAV6 ist auch für AAV9 kein Unterschied in der Transduktion der Leber

mit der Kombination AAV9:Mikrosphären im Vergleich zur Kontrolle ohne Mikrosphären zu erkennen ($4,9 \times 10^4 \pm 3,3 \times 10^4$ vs. $1,1 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$, $p = 0,10$).

Die Gegenüberstellung der Daten von AAV und AAV:Mikrosphären, ob mit AAV6 oder AAV9, zeigt eine deutliche Erhöhung der Transduktionseffizienz beim Einsatz von Ultraschall – vermittelter Zerstörung der Mikrosphären. Somit hat diese Form der Applikation das Potential sowohl für Anwendungen im Großtiermodell, als auch in der Klinik am Patienten.

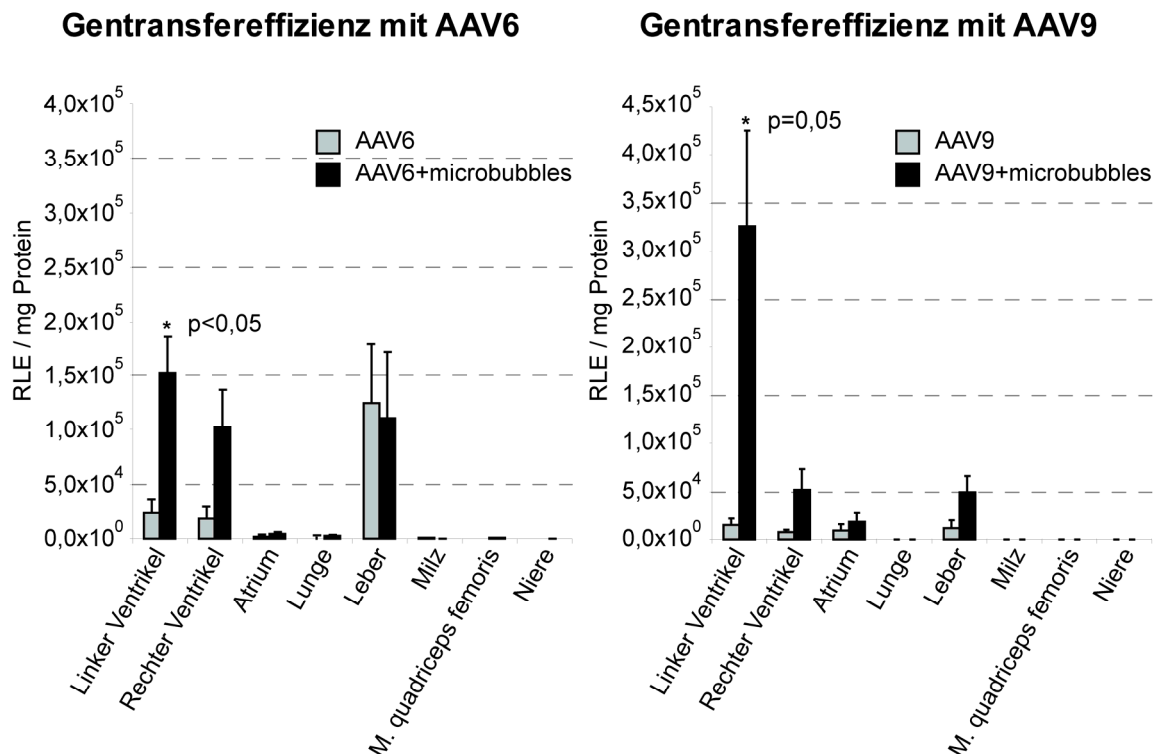


Abbildung 3.13: Gentransfereffizienz nach Ultraschall gestütztem viralen Gentransfer. Gezeigt wird die auf die Proteinkonzentration normalisierte Luziferaseaktivität der einzelnen Gewebe [RLE /mg Protein], nach Applikation von AAV6 (linke Seite) bzw. AAV9 (rechte Seite) in Kombination mit oder ohne Mikrosphären. Alle Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, * $p \leq 0,05$, (AAV6: jeweils $n = 5$; AAV9: jeweils $n = 4$)

3.4.3. Histologische Analyse der EGFP – Reporterexpression im Herzen

Um eine visuelle Evaluation der Verteilung der Reporterexpression innerhalb des Myokards vornehmen zu können, wurde Ratten analog zur Validierung der Gentransfereffizienz (Kap. 3.4.2) AAV9 (1×10^{11} virale Genome) mit EGFP als Reporter (Kap. 3.3.1) in der Kombination mit Mikrosphären ($n = 4$) oder ohne Mikrosphären ($n = 2$) appliziert (Kap. 2.2.6.1). Die Kryokonservierung (Kap. 2.2.7.2) der dissezierten Herzen, mit anschließender Erstellung und Auswertung von

Dünnschnittpräparaten (Kap. 2.2.7.3), erfolgte vier Wochen nach Injektion der Tiere. Zur genauen Bestimmung der positiv transduzierten und EGFP exprimierenden Zellen gegenüber nicht transduzierten Zellen wurden die Dünnschnittpräparate zusätzlich mit Alexa Fluor gekoppeltem Phalloidin behandelt, welches durch eine irreversible Bindung an Aktin eine Darstellung der Kardiomyozyten ermöglicht (Kap. 2.2.7.6). Während in der Übersicht des Herzens von Tieren ohne Ultraschallbehandlung kaum EGFP – positive Zellen zu finden waren (Abb. 3.14, Übersicht linke Seite), konnte im ganzen Herzen und insbesondere in der anterioren Wand des linken Ventrikels bei Ultraschall behandelten Tieren eine starke EGFP – Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.14, Übersicht rechte Seite). Die Bestätigung, dass es sich bei den grün fluoreszierenden Zellen tatsächlich um Kardiomyozyten handelt, brachte die Auswertung der Überlagerung von Aktinfluoreszenz (rot) (Kap. 2.2.7.6) mit der EGFP – Fluoreszenz (grün) (Abb. 3.14, Vergrößerung, rechte Seite).

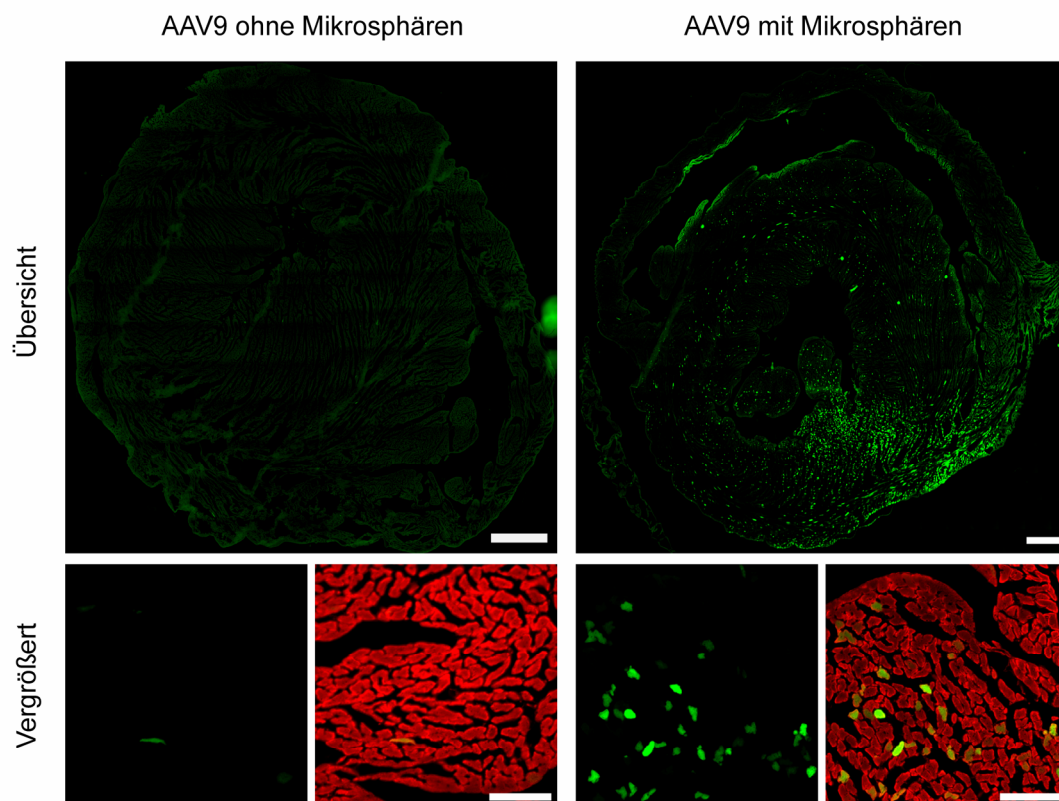


Abbildung 3.14: Lokalisation der Reportergenexpression nach Ultraschall gestütztem Gentransfer in Rattenherzen ohne (linke Seite) und mit 1×10^{11} Partikeln von AAV9 – EGFP bealadenen Mikrosphären (rechte Seite). Die obere Reihe zeigt transversale Übersichtsbilder des Herzens mit EGFP-Fluoreszenz (grün, Balken= 500 μ m). Die Untere Reihe zeigte die 40 fachen Vergrößerungen (Balken= 50 μ m) mit einer Kombination aus EGFP-Fluoreszenz (grün) und einer Aktinfärbung (Phalloidin=rot).

Zusätzlich zur Evaluation der visuellen Reportergenexpression sollte histopathologisch eine Zerstörung des Gewebes durch die Mikrosphären sowie eine Immunreaktion auf das applizierte AAV9 oder das exprimierte Reportergen ausgeschlossen werden. Dazu wurden mit HE – gefärbte (Kap. 2.2.7.8), kryokonservierte Ultradünnschnitte hinsichtlich Fibrose, Nekrose und vermehrter Infiltration von eosinophilen und basophilen Granulozyten untersucht. Weder in den mit AAV oder AAV:Mikrosphären behandelten Tiere war ein Unterschied hinsichtlich der zuvor genannten Parameter gegenüber einer gesunden und unbehandelten Kontrolle zu erkennen (Abb. 3.15).

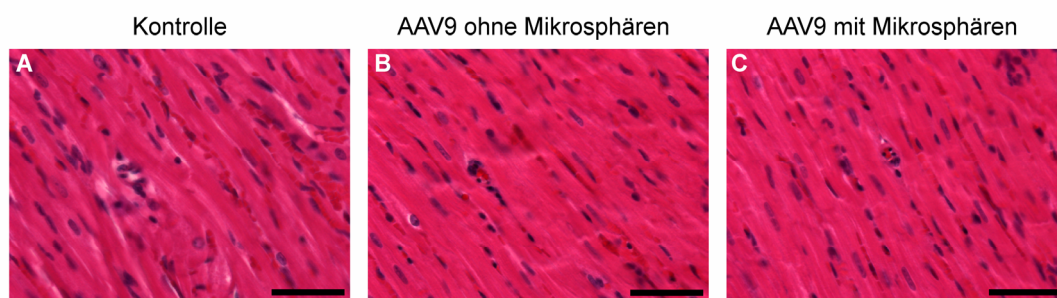


Abbildung 3.15: Histopathologische Untersuchung des Myokards. Dargestellt sind die mit HE – gefärbten Kardiomyozyten der **A** unbahandelten Kontrolle, **B** der mit AAV9-EGFP behandelten und **C** der mit AAV9-EGFP und Mikrosphären behandelten Ratte. (Balkengröße= 50 μ m)

3.5. Gentherapieansatz der Kardiomyopathie durch Gentransfer einer verkürzten Dystrophin cDNA in Dystrophin defiziente Mäuse

Durch vorangegangene Reportergenstudien konnte bestätigt werden, dass AAV9 zu einer verbesserten kardialen Transduktionsrate in Nagern führt (Kap. 3.3 und 3.4). Deshalb sollte in einer präklinischen Studie die Kombination aus dem kardial spezifischen CMV unterstütztem MLC0.26kb – Promotor und AAV9 zum therapeutischen Gentransfer angewandt werden. Dazu sollte eine verkürzte Dystrophin cDNA (μ Dys) in das Modell der Dystrophin defizienten Mdx – Maus transferiert werden, welche pathologische Veränderungen im Herz – und Skelettmuskel aufweist (Kap. 3.2.).

3.5.1. Expression des μ Dystrophins *in vitro*

Der initiale Schritt des *in vivo* Gentransfers ist die Kontrolle der Expression des Transgens *in vitro*, in diesem Falle die des μ Dystrophins (μ Dys). Dazu wurden initial die entsprechenden Konstrukte erstellt (Kap. 2.2.1.11) und anschließend sowohl das CMV-(μ Dys-lackUTR/Neo) - Konstrukt (CMV- μ Dys) (Kap. 2.2.1.11), als auch das

CMV-MLC0.26kb-(μ Dys-lackUTR/Neo) – Konstrukt (MLC0.26- μ Dys) mittels Lipofektion in HEK293T – Zellen transfiziert (Kap. 2.2.2.2). Die Kontrolle der Expression des μ Dys erfolgte drei Tage nach Transfektion mittels Western Blot (Kap. 2.2.4.5 bis 2.2.4.6). Dabei entsprach das im Western Blot, durch einen Carboxyterminus spezifischen Dystrophinantikörper, detektierte Protein in beiden Fällen exakt der zu erwartenden Bandengöße von 125 kDa des μ Dystrophins (Abb. 3.16, Pfeil - μ D). Allerdings ist anzumerken, dass es bei beiden μ Dys – Konstrukten zusätzlich zur Expression eines alternativen μ Dys von ca. 100 kDa kam. In der untransfizierten Kontrolle konnte keine Expression des μ Dystrophin nachgewiesen werden. Somit wurde der für den *in vivo* Gentransfer als Voraussetzung geltende *in vitro* Expressionsnachweis des CMV- μ Dys bzw. MLC0.26- μ Dys erbracht.

Western Blot von Zell-Lysat transfizierter HEK293T

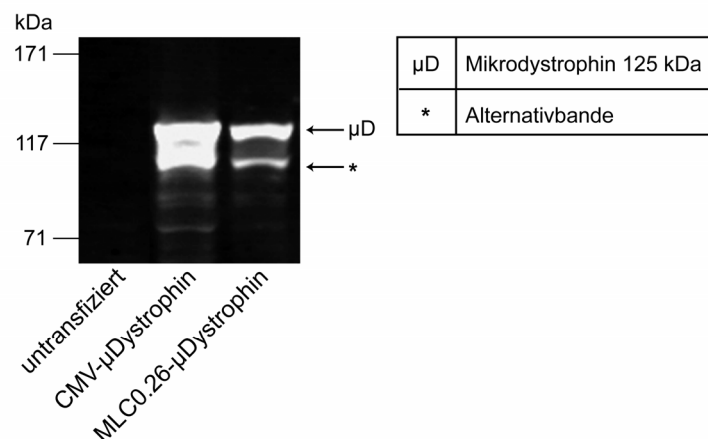
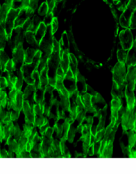
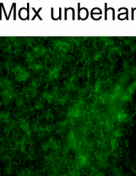
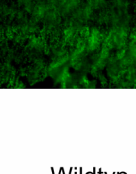
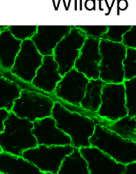
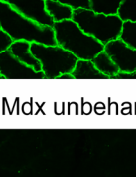

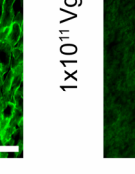
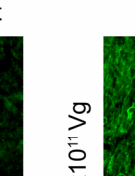
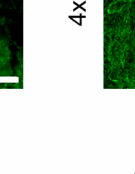
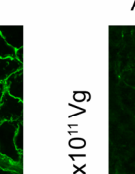
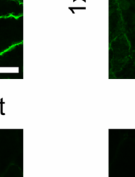



Abbildung 3.16: Expression des μ Dystrophins *in vitro*. Western Blot Analyse des Zell-Lysates von HEK293T, welche mit CMV- μ Dys bzw. CMV-MLC0.26- μ Dys transfiziert wurden.

3.5.2. Vektordosis abhängige Expression des μ Dystrophins *in vivo*

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Reporterstudien (Kap. 3.3) konnte gezeigt werden, dass die Transduktionseffizienz von AAV9 durch Veränderung der Vektordosis beeinflusst werden kann (Kap. 3.3.5). Aus diesem Grund erfolgte zusätzlich zur Untersuchung der *in vivo* μ Dys - Expression per se, in einem initialen Ansatz die Titration der Vektordosis, hinsichtlich einer positiven kardialen μ Dys – Expression. Dazu wurden 8 Wochen alte männliche Mdx – Mäuse (Kap. 1.2.4.) mit AAV9-CMV- μ Dys (AAV9-CMV- μ Dys) bzw. AAV9-CMV-MLC0.26kb- μ Dys (AAV9-MLC0.26- μ Dys) mit einer Vektordosis von 1×10^{11} vG ($n=1$) bzw. 4×10^{11} vG ($n=1$) für CMV- μ Dys und 1×10^{11} vG ($n=1$) bzw. 1×10^{12} vG ($n=1$) für MLC0.26- μ Dys in die Schwanzvene injiziert. Vier Wochen nach Injektion wurden die entsprechenden

	Wildtyp	AAV9-CMV- μ Dys	AAV9-MLC0.26- μ Dys
Herz			
	1x10 ¹¹ Vg		
Mdx unbehandelt			
	4x10 ¹¹ Vg	1x10 ¹² Vg	
M. quadriceps femoris			
	1x10 ¹¹ Vg		
Mdx unbehandelt			
	4x10 ¹¹ Vg	1x10 ¹² Vg	

Auch die Lokalisation des μ Dystrophins an der Plasmamembran der Herzmuskelzelle deutet auf einen korrekten Einbau des μ Dystrophins hin. Im Skelettmuskel hingegen

konnte für das AAV9-MLC0.26- μ Dys keine Expression bei hoher Vektordosis festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte das AAV9-CMV- μ Dys eine lokal beschränkte Präsenz des μ Dys bei einer Vektordosis von 4×10^{11} vG, bei der das μ Dystrophin ebenfalls an der Skelettmuskelfibrille lokalisiert ist. Entsprechend der Erwartungen waren in den unbehandelten Mdx – Kontrollen und den Wildtypen keine bzw. eine vollständige Dystrophinfluoreszenz des Herz- und Skelettmuskels erkennbar.

Zur Überprüfung unspezifischer Transduktion von AAV9- μ Dys wurden Leber - und Milzproben der AAV9-MCL0.26- μ Dys bzw. AAV9-CMV- μ Dys injizierten und der unbehandelten Mdx – Maus immunhistochemisch untersucht. Dazu wurden Dünnschnittpräparate der kryokonservierten Leber und Milz erstellt (Kap. 2.2.7.3.) und mit dem oben bereits erwähnten Dystrophinantikörper behandelt. Die Detektion der immunhistochemischen Färbung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dabei konnte sowohl in der Leber als auch in der Milz keine Fluoreszenz nach Behandlung der Tiere mit einem der beiden Dystrophinkonstrukte in hoher Vektordosis nachgewiesen werden (Abb. 3.18).

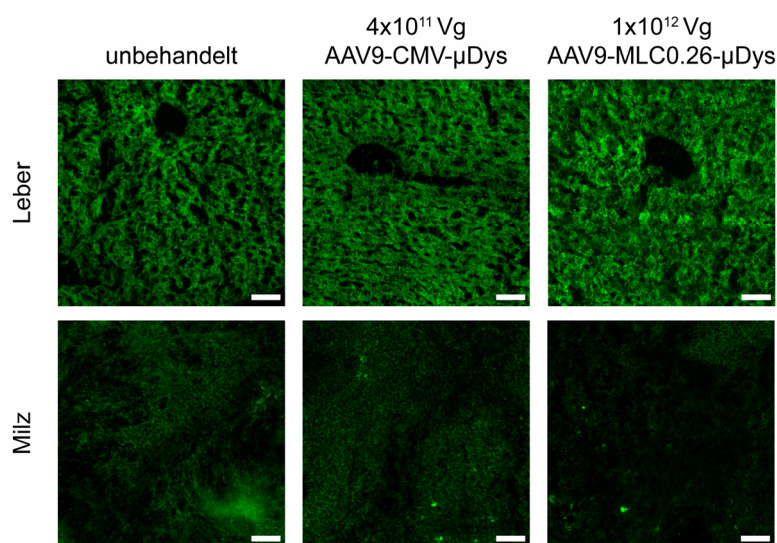


Abbildung 3.18: Immunfluoreszenzanalyse zur Untersuchung unspezifischer Milz- und Leberexpression von μ Dys. Dargestellt sind mit AAV9- μ Dys transduzierte und unbehandelter Mdx – Tiere. (Balkengröße= 50 μ m)

Die Bestätigung der immunhistochemischen Untersuchungen bezüglich der Expression des μ Dys erfolgte mittels proteinbiochemischer Methoden im Western Blot (Kap. 2.2.4.6.). Die Auswertung der im Odyssey – System erstellten Abbilder der PVDF-Membran (Abb. 3.19) bestätigten die immunhistochemischen Analysen für

AAV9-CMV- μ Dys und AAV9-MLC0.26- μ Dys im Herzen und der Leber, zeigten aber ein differenzierteres Bild im Skelettmuskel.

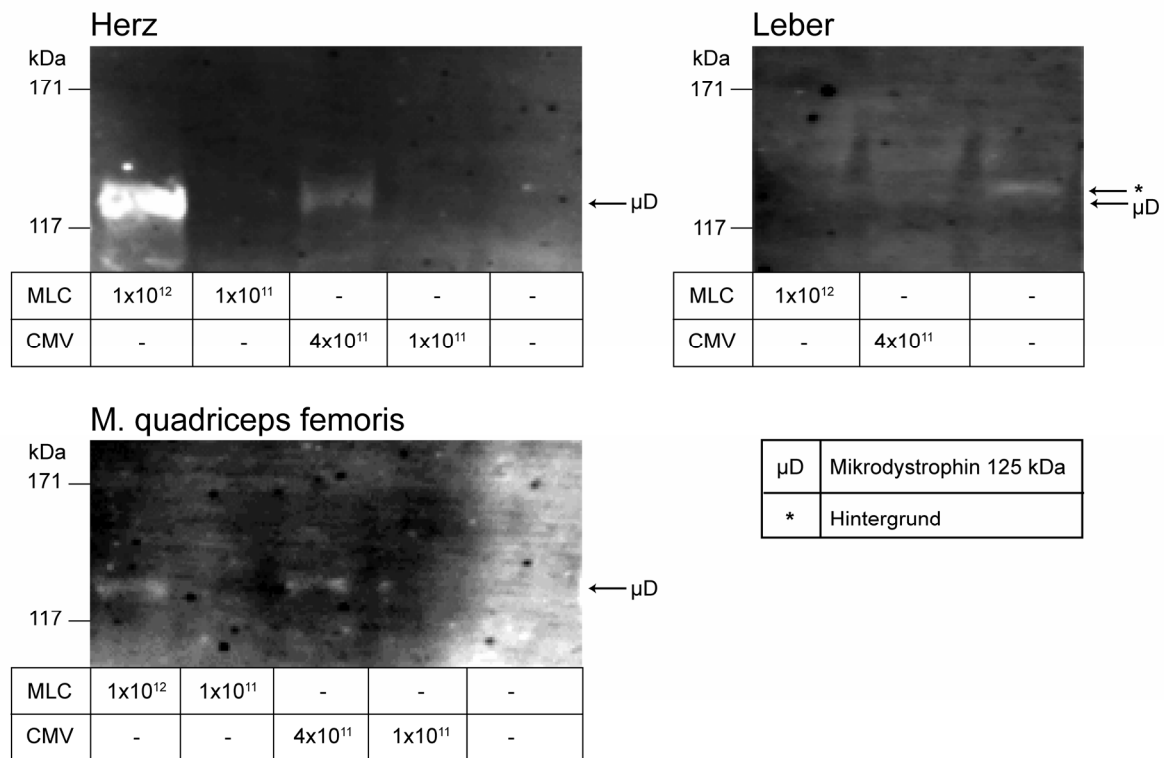


Abbildung 3.19: Expressionsstärke des μ Dystrophins *in vivo*. Western Blot Analyse der Gewebe - Lysate AAV9- μ Dys transduzierter Mdx - Tiere und untransduzierter Kontrolltiere in Abhängigkeit des CMV – bzw. CMV-MLC0.26 – Promotors und applizierter Vektordosis.

Demnach konnte im Herzen zwar eine diskretierte 125 kDa große Dystrophinbande bei hoher Vektordosis (4×10^{11} bzw. 1×10^{12} vG) nachgewiesen werden, jedoch unterscheidet sich die Expression des μ Dys durch AAV9-MLC0.26- μ Dys um das ca. 6 fache (ausgewertet per ImageJ, normalisiert auf die aufgetragene Proteinmenge) von der des AAV9-CMV- μ Dys. Bei Betrachtung des Skelettmuskels hingegen konnte im Western Blot auch für das AAV9-MLC0.26- μ Dys bei hoher Vektordosis konträr zum fehlenden immunhistologischen Nachweis eine schwache Expression des μ Dys nachgewiesen werden (Abb. 3.19). Vergleicht man im Skelettmuskel die Expressionsstärke des CMV vermittelten μ Dys Transfers mit denen des CMV-MLC0.26 vermittelten Transfers, so ist kein Unterschied feststellbar. Betrachtet man jedoch die Expression des μ Dys im Herzen einer AAV9-MLC0.26- μ Dys transduzierten Mdx – Maus im Kontrast zur Expression des μ Dys im Skelettmuskel der gleichen Maus, so weist das Herz einen ca. 14 fache höhere Expression des μ Dys auf. Analog zur Immunfluoreszenzuntersuchung zeigten sowohl AAV9-CMV- μ Dys als auch AAV9-MLC0.26- μ Dys bei niedriger Vektordosis keine Expression des

μ Dys im Herzen oder Skelettmuskel. Darüber hinaus konnte die kardiale Spezifität μ Dys durch fehlende Expression in der Leber bestätigt werden (Abb. 3.19).

3.5.3. Histopathologische Validierung nach Gentransfer

Ziel des kardialen Gentransfers in Dystrophin defiziente Mäuse (Mdx) ist vor allem eine Rekonstitution des Myokards. Um eine Aussage über die Ausprägung der Fibrose und den Zustand des Gewebes zu treffen, wurden Ultradünnschnitte (Kap. 2.2.7.3.) des Herzens und des Skelettmuskels der zuvor auf μ Dys - Expression untersuchten (Kap. 3.5.2) Wildtypiere, AAV9- μ Dys behandelten und unbehandelten Mdx - Mäuse angefertigt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch nach HE - bzw. van Gieson - Färbung. Dabei fiel vor allem bei den mit AAV9- μ Dys behandelten Herzen (jeweils $n=1$), unabhängig vom Protokoll, eine reduzierte oder fehlende Infiltration von Granulozyten im Vergleich zur unbehandelten Mdx - Maus auf (Abb. 3.20, Stern). Jedoch konnte in der van Gieson Färbung der mit AAV9-CMV- μ Dys behandelten Maus eine ausgeprägte Fibrose nachgewiesen werden, welche bei der AAV9-MLC0.26- μ Dys nicht zu finden war (Abb. 3.20, Pfeil).

Bei Betrachtung des Skelettmuskels (Abb. 3.20) hingegen sind zwischen AAV9- μ Dys und unbehandelten Mdx – Mäusen keine histopathologischen Unterschiede zu erkennen. Alle hier dargestellten Mdx – Mäuse zeigen starke Granulozyteninfiltrationen (Abb. 3.20, Stern) und eine beginnende Fibrose (Abb. 3.20, Pfeil). Bei allen Mdx - Mäusen sind die typisch dystrophen Bereiche (Kap. 3.2.1) mit morphologischen Veränderungen bezüglich Größe und Verschiebung des Nukleus der Muskelzelle zur Mitte hin zu erkennen (Abb. 3.20).

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass der Ansatz eines AAV9 gestützten μ Dys Transfers den Nachweis der Expression des Konstruktes erbrachte, und teilweise eine Rekonstitution des Myokards ermöglichte.

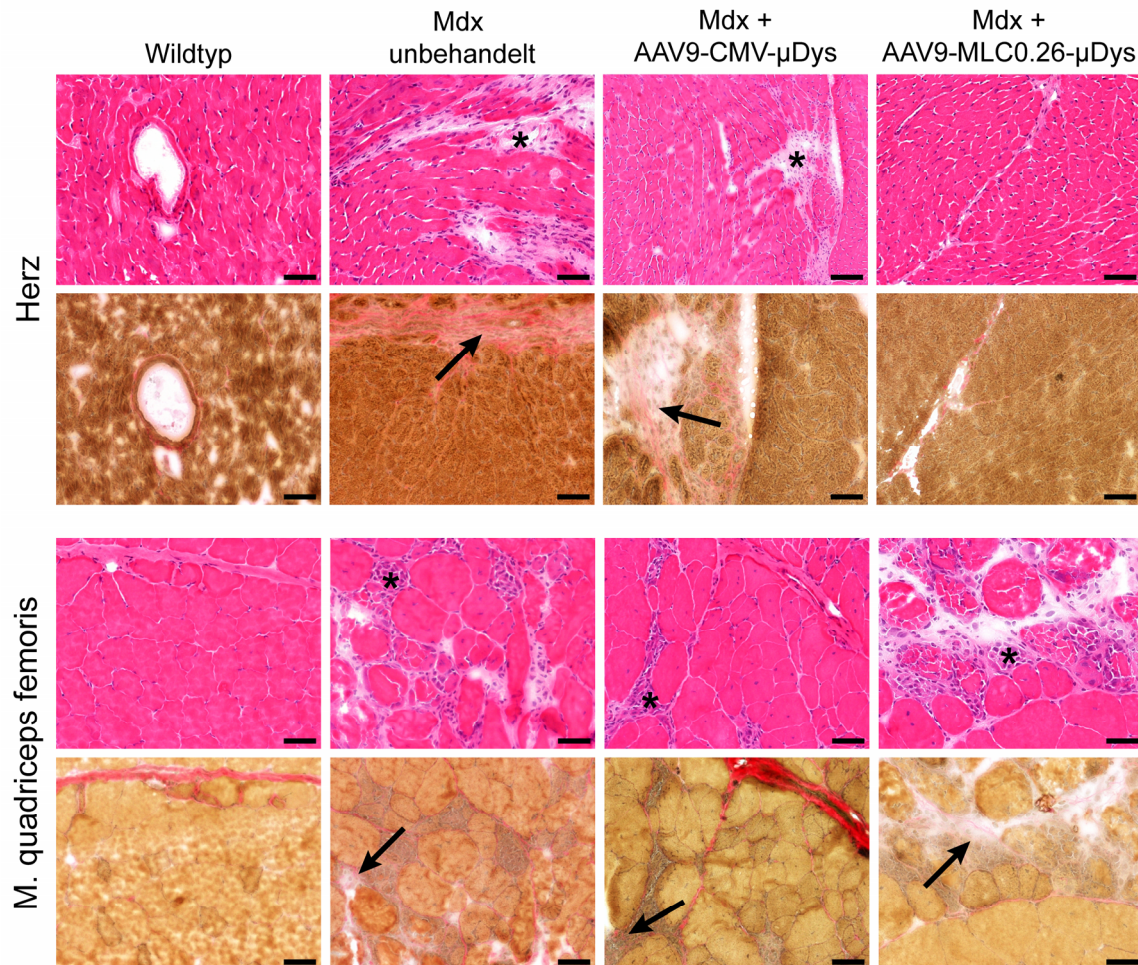


Abbildung 3.20: Histopathologische Untersuchungen nach Gentransfer. Präsenz von Fibrose und Granulation in transversalen HE bzw. van Gieson gefärbten Ultradünnschnitten von Herz - und Skelettmuskel in AAV9-CMV – bzw. AAV9-CMV-MLC0.26kb-μDys behandelten Mdx - Mäusen. Als Referenz dienten unbehandelte Mdx - Tiere und Wildtypiere. (Balkengröße= 50 μm)

3.5.4. Immunstatus nach Gentransfer

Durch die in Kapitel 3.5.2. beschriebenen Analysen der μDys – Expression *in vivo* konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zwischen Herz - und Skelettmuskel eine bis zu 14 fach geringere Expression des μDys im Skelettmuskel zu detektieren war. Ein Grund dafür könnte eine mögliche Immunreaktion im Skelettmuskel auf den Vektor oder das Transgen sein, welche eine Eliminierung der transduzierten Zellen zur Folge hätte. Zur Überprüfung dieser These wurden transversale Ultradünnschnitte des Herz – und Skelettmuskels von unbehandelten Mdx – Mäusen, AAV9-CMV-μDys und AAV9-CMV-MLC0.26kb-μDys transduzierten Mdx - Mäusen (jeweils n= 1) angefertigt und auf Anwesenheit von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersucht (Abb. 3.21). Dabei konnte in keiner der untersuchten Mdx – Mäuse ein

Nachweis bezüglich Akkumulation von CD4⁺ und CD8⁺ positiven T – Zellen nach Applikation von AAV9- μ Dys erbracht werden.

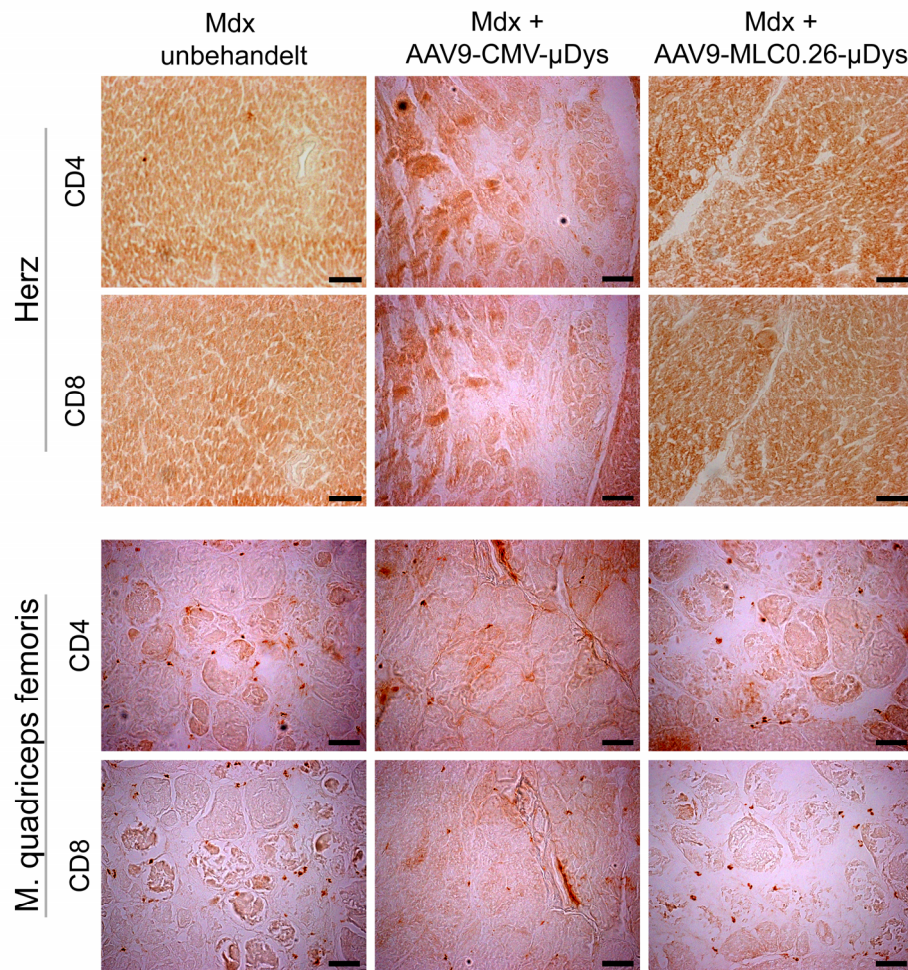


Abbildung 3.21: Immunologische Untersuchung nach Gentransfer. Dargestellt sind Vergrößerungen des Herz – und Skelettmuskels nach CD4 bzw. CD8 - Färbung von AAV9-CMV - bzw. AAV9-CMV-MLC0.26kb- μ Dys behandelten Mdx - Tieren im Vergleich zu einer unbehandelten Mdx - Maus. (Balken= 50 μ m)

3.5.5. Altersabhängige Expression des μ Dystrophins *in vivo*

Eine weitere Fragestellung dieser Vorstudie war die Abhängigkeit des Gentransfers vom Alter der Mdx - Mäuse. Dazu wurden 6 und 42 Wochen alte Mdx – Mäuse (jeweils n= 1) mit 1×10^{12} viralen Genomen des AAV9-CMV-MLC0.26kb- μ Dys (AAV9-MLC0.26- μ Dys) injiziert und vier Wochen nach Injektion mittels Immunfluoreszenz (Kap. 2.2.7.6.) auf die Präsenz des μ Dys im Herz - und Skelettmuskel untersucht (Abb. 3.22). Sowohl beim jungen, als auch beim alten Mdx - Tier mit Gentransfer konnte, im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren, eine Expression des μ Dys im Myokard nachgewiesen werden (Abb. 3.22). Zusätzlich erfolgte bei beiden Altersgruppen die Lokalisation des μ Dys an der Plasmamembran, was eine korrekte

Integration des μ Dys auch im fortgeschrittenen Alter hinweist. Ein Nachweis des μ Dys im Skelettmuskel konnte nur der 6 Wochen alten, mit AAV9-MLC0.26- μ Dys behandelten Mdx - Maus erreicht werden. Zusammengefasst ist davon auszugehen, dass der kardiale Gentransfer des μ Dystrophins nicht vom Alter einer Mdx – Maus abhängig ist.

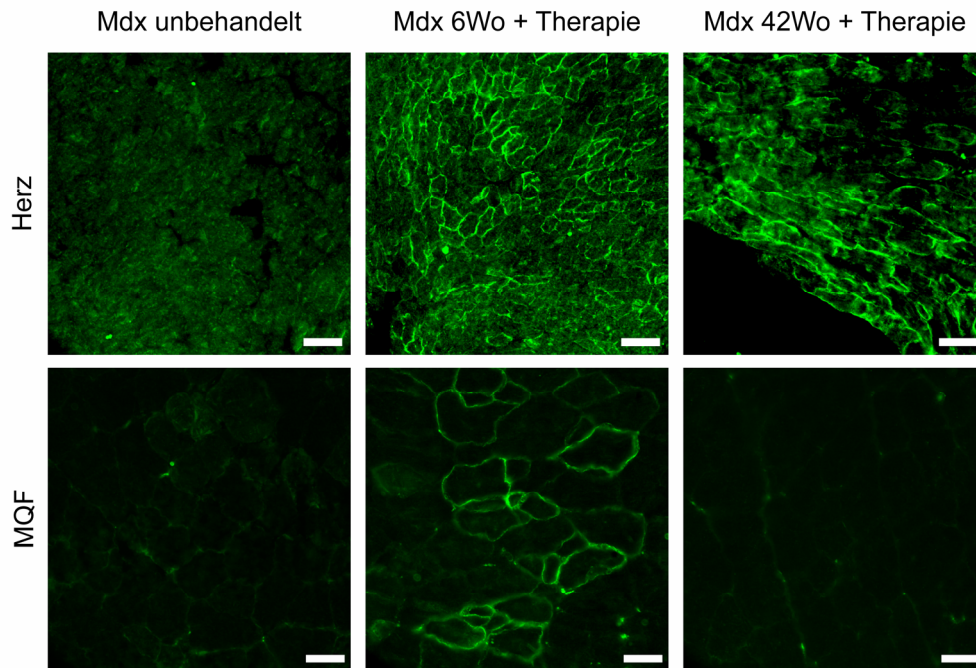


Abbildung 3.22: Immunfluoreszenzanalyse zur Untersuchung der μ Dys – Expression bei Mdx - Tieren unterschiedlichen Alters. Die Injektion mit 1×10^{12} vG des AAV9-CMV-MLC0.26kb- μ Dys erfolgte im Alter von 6 bzw. 42 Wochen, die Analyse des Herz – und Skelettmuskels auf μ Dys - Expression 6 Wochen nach Injektion. (Balkengröße= 50 μ m)

4. Diskussion

4.1. Verbesserung der Effizienz und Spezifität von AAV9 – Vektoren durch eine transkriptionelle Zielrichtung

4.1.1. Vorteile der Kombination aus gezielter Transduktion und Transkription

Durch vorangegangene Studien ist bekannt, dass eine kombinierte transduktionelle und transkriptionelle Zielrichtung zu einer erhöhten Spezifität und Effektivität eines kardialen Gentransfers mit AAV des Serotyps 2 führt (Müller *et al.*, 2006). Um dies auch für den AAV – Serotyp 9 zu bestätigen, welcher per se eine erhöhte Effizienz bei systemischer Applikation aufweist (Inagaki *et al.*, 2006; Pacak *et al.*, 2006; Bish *et al.*, 2008; Zincarelli *et al.*, 2008), sollte grundlegend geklärt werden, ob eine zusätzliche transkriptionelle Zielrichtung mit AAV9 zu einer erhöhten Transgenexpression im Mausherz führt. Das zunächst untersuchte Reporter-genexpressionsprofil der transkriptionell unspezifischen Kombination aus AAV9 und CMV – Promotor zeigte dabei das gleiche Transduktionsverhalten, mit hoher Reporter-genexpression in Herz und Leber (Kap. 3.3.1., Abb. 3.7). Vergleicht man jedoch dieses transkriptionell unspezifische AAV9 – Reporter-genexpressionsprofil mit dem eines transkriptionell gesteuerten AAV9 – Profils (CMV-MLC1.5kb reguliert), wird die Wirkung des transkriptionellen Targetings deutlich. Während die Verwendung des unspezifischen CMV – Promotors die transkriptionelle Zielrichtung nicht beeinflusste, konnte durch den CMV-MLC1.5kb – Promotor eine 200 - 400 fach erhöhte kardiale Reporter-genexpression im Vergleich zum CMV – Promotor erreicht werden (Kap. 3.3.1., Abb. 3.7). Die deutlich gesteigerte Reporter-genexpression durch den gewebespezifischen Promotor wurde in ähnlicher Größenordnung auch bei Verwendung des CMV-MLC1.5kb Promotors in AAV2 beobachtet. (Müller *et al.*, 2006). Zusätzlich zum transkriptionellen Targeting können Modifikationen des Viruskapsids die Spezifität der Transduktion für bestimmte Gewebearten verbessern. Eine dieser Modifikationen bestand darin, die Bindung von AAV2 an Heparansulfatproteoglykan auf Hepatozyten durch Mutagenese basischer Aminosäuren (R484E; R585E) zu verhindern (Müller *et al.*, 2006). Als direktes Resultat dieser Veränderung war eine Erhöhung der kardialen

Affinität des AAV – Vektors bei gleichzeitiger Reduktion der Lebertransduktion zu verzeichnen. Im direkten Vergleich der transkriptionellen Zielrichtung von AAV9 und AAV2(R484E; R585E) konnte für AAV9 eine 1000 fach verbesserte Transduktionseffizienz erreicht werden (Kap.3.3.2., Abb. 3.8). Auch das Verhältnis von Herz - und Lebertransduktion zwischen AAV9 und AAV2(R484E; R585E) (9607 vs. 5759) demonstriert die Überlegenheit des AAV9 beim kardialen Gentransfer. Allerdings ist anzumerken, dass das transkriptionelle Targeting des AAV9 mit dem CMV verstärkten MLC – Promotor im Gegensatz zu AAV2(R484E; R585E) zu einer Erhöhung der Reportergenexpression im Skelettmuskel führte. Gäbe es im direkten Vergleich von AAV9-CMV und AAV9-CMV-MLC1.5kb keinen Unterschied der Reportergenexpression im Skelettmuskel, so wäre die erhöhte Affinität des AAV9 zum Skelettmuskel per se eine mögliche Erklärung für den Unterschied zwischen AAV9 und AAV2(R484E; R585E) (Inagaki *et al.*, 2006; Pacak *et al.*, 2006; Zincarelli *et al.*, 2008). Jedoch ist zwischen unspezifischem CMV – Promotor bzw. kardial spezifischem CMV-MLC1.5kb - Promotor, in Kombination mit AAV9, eine signifikant erhöhte Skelettmuskelexpression bei CMV-MLC1.5kb erkennbar (Kap.3.3.2., Abb. 3.8). Es ist bekannt, dass der homologe MLC – Promotor nach systemischer Applikation in neonatale Mäuse bislang keine Reportergenexpression im Skelettmuskel und nur zu einer marginale Expression im Herzen führt (Pacak *et al.*, 2008). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Unterstützung durch den zusätzlichen CMV – Anteil des hier verwendeten MLC - Promotors nicht nur zu einer erhöhten kardialen Expression des Reportergens führt, sondern auch einen Einfluß auf die Expression in anderen Geweben hat. Betrachtet man jedoch die kardiale Transduktionseffizienz der homologen Promotoren aus eben erwähnter Studie mit der des hier verwendeten, CMV verstärkten heterologen Promotors, zeigt sich eine 10^6 fach höhere Effizienz des heterologen Promotors. Somit zeichnet sich, trotz einer gewissen Unspezifität, ein klarer Vorteil für die Verwendung heterologer Promotoren zum kardialen Gentransfer ab. Um die Gewebespezifität bei Verwendung heterologer Promotoren in Kombination mit AAV weiter zu verbessern, könnten wie bereits erwähnt, Kapsidmodifikationen zum gewünschten Ergebnis führen. So entstand durch DNA – shuffling ein neues AAV, dessen kardiale Spezifität nach systemischer Injektion in der Maus gegenüber AAV9 erhöht ist (Yang *et al.*, 2009). Auch das für AAV2 bereits erfolgreich angewandte Targeting durch eine, auf dem Kapsid exprimierte, randomisierte Peptidbibliothek (Waterkamp *et al.*, 2006), wäre auf AAV9

übertragbar und könnte somit zu einer hocheffizienten und gewebespezifischen Transduktion führen.

4.1.2. Erhöhung der verpackbaren Transgengröße durch Reduktion der Promotorlänge

Durch die Verwendung heterologer Promotoren zum Gentransfer mit Adeno-assoziierten Viren (AAV) ist ein wichtiger Schritt in Richtung einer effizienten und spezifischen Transgenexpression gemacht worden. Um die Effizienz der Expression aber weiter zu steigern, können modifizierte AAV – Genome verwendet werden, welche zur Transkription des Transgens keine Doppelstrangsynthese mehr benötigen (McCarty *et al.*, 2001; McCarty *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). Der limitierende Faktor dieser Doppelstrangvektoren ist die reduzierte Verpackungskapazität von ca. 2,2 kb (Wang *et al.*, 2003). Problematisch könnte die Größe von 2,1 kb des heterologen CMV-MLC1.5kb – Promotors werden, welcher zusammen mit weiteren essentiellen Sequenzen, wie einem PolyA – Signal oder den ITRs (Kap. 1.4.1.), die Verpackungskapazität ohne eine transgene cDNA bereits ausreicht. Daher wurde der Versuch unternommen, durch transkriptionelle Regulation mittels eines CMV verstärkten „Minimal“ – MLC – Promotors einen effizienten kardialen Gentransfer zu erzielen. Vorangegangene Studien mit einem 250 bp – Fragment des MLC – Promotors konnten bestätigen, dass dieser „Minimalpromotor“ in der Lage ist, eine kardiale Reporterexpression bei transgenen Mäusen zu vermitteln (O'Brien *et al.*, 1993). In initialen vergleichenden Analysen des MLC1.5 kb mit dem auf 260 bp verkürzten MLC (CMV-MLC0.26kb) wurde, im Kontext von Einzelstrangvektoren, kein Unterschied in der Effizienz einer kardialen Reporterexpression beider Promotorversionen festgestellt (Kap. 3.3.3., Abb. 3.9). Dies führt wiederum zu dem Schluss, dass beide Promotorversionen für einen kardialen Gentransfer geeignet sind. Jedoch ist anzumerken, dass der CMV-MLC0.26kb – Promotor neben der effizienten kardialen Transgenexpression auch eine unspezifische Expression im Skelettmuskel verursacht (Kap. 3.3.3., Abb. 3.9). Da die Verkürzung des Promotors sowohl die Reduktion nichtregulatorischer Sequenzen, als auch die Reduktion regulatorischer Sequenzen (P – Element, (Qasba *et al.*, 1992)) umfasst, kann hierin die Ursache für die unspezifische Expression im Skelettmuskel gesehen werden. Überraschender Weise zeigte sich, dass die CMV-MLC0.26kb – Promotor vermittelte Reporterexpression im Kontext mit

Doppelstragvektoren nach systemischer Applikation mit AAV9, im Vergleich zum CMV – Promotor, weitgehend selektiv im Herzen stattfinden (Kap. 3.3.4., Abb. 3.10). Auch wenn die Kombination aus AAV9 und dem CMV-MLC0.26kb – Doppelstrangvektor in der Maus zusätzlich zu einer geringen Lebertransduktion führt (Kap. 3.3.5, Abb. 3.11), fällt diese jedoch viel geringer aus, als die nahezu vollständige Transduktion der Leber nach Applikation von 10^{12} vG bei Inagaki und Kollegen. Somit führt die systemische Anwendung von Doppelstragvektoren, in Kombination mit dem CMV verstärkten MCL0.26kb – Promotor und AAV9, zu einem effizienten und spezifischen Gentransfer ins Mausherz.

4.2. Ultraschall vermittelte Transduktion von AAV – Vektoren

4.2.1. Ultraschall gestützte Zerstörung von AAV beladenen Mikrosphären zur Effizienzsteigerung des kardialen Gentransfers

Aufgrund von Untersuchungen, nach denen sich die nichtinvasive systemische Applikation von Adeno-assoziierten Viren (AAV) zum Gentransfer im Mausmodell als praktikabel erwiesen hat (Kap. 4.1.), könnte geschlussfolgert werden, dass eine intravenöse Applikation bei gleicher Vektordosis (pro Kilogramm Körpergewicht) in einer äquivalenten Transduktionseffizienz im Großtiermodell resultiert. Tatsächlich führt die systemische Gabe aber zu unerwünschten Nebeneffekten, wie der Ausbildung einer Immunantwort und der daraus resultierenden Eliminierung transgenexprimierender Zellen und des Vektors. Zusätzlich dazu ist die Herstellung der AAV – Vektoren für größere Tiere oder den Menschen kostenintensiv. Um den Faktor Vektordosis zu reduzieren und eine mögliche immunologische Interferenz zu verringern, wurde für AAV, in Anlehnung an adenovirale Vektoren und Plasmid DNA (Shohet *et al.*, 2000; Bekeredjian *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Christiansen *et al.*, 2003), die Möglichkeit eines Gentransfers auf der Basis ultraschallvermittelter Zerstörung von Mikrosphären (*microbubbles*= MB) getestet. Analog zu den eben genannten Studien konnte mittels ultraschallgestütztem Gentransfer in der Ratte sowohl für AAV6 als auch für AAV9 eine signifikant erhöhte kardiale Reporterexpression bei einer totalen Vektordosis von 10^{11} vG im Vergleich zur systemischen Applikation ohne Ultraschall erreicht werden (Kap. 3.4.2., Abb. 3.13). Da ausgeschlossen werden kann, dass der in dieser Arbeit verwendete Ultraschall per se zu einer Erhöhung der Transduktion führt (Bekeredjian *et al.*, 2003), ist die verbesserte Transduktionseffizienz des Herzens auf die Beladung der Mikrosphären

mit AAV – Vektoren zurückzuführen. Grundlage der erhöhten Transduktionseffizienz sind die durch das Zerplatzen AAV beladener Mikrosphären entstehenden Flüssigkeitsströme, welche die Permeabilität der Kapillaren im Herzen erhöhen und somit für eine lokal erhöhte Vektorkonzentration sorgen (Postema *et al.*, 2004). Neben einer erhöhten AAV6 vermittelten Transduktionseffizienz des Rattenherzens ist trotz Verwendung des CMV-MLC1.5kb - Promotors eine erhöhte Transgenexpression in der Leber zu verzeichnen (Kap. 3.4.2., Abb. 3.13), welche bei Mäusen nicht vorkommt (Müller *et al.*, 2006). Da die Transduktion der Leber unabhängig vom herzgerichteten transthorakalen Ultraschall erfolgte (Kap. 3.4.2., Abb. 3.13) sind speziesbedingte Veränderungen des Lebertropismus von AAV6 eine Erklärung für diese Beobachtung. Hinweise für speziesbedingte Tropismusveränderungen liefert der direkte Vergleich des Transduktionsverhaltens von AAV9 und AAV6 zwischen Mäusen und Ratten. Während in Mäusen AAV9 gegenüber AAV6 zu einer höheren Transgenexpression der Leber führt (Zincarelli *et al.*, 2008), wird bei Ratten eine höhere hepatische Reportergenexpression mit AAV6 beobachtet (Kap. 3.4.2., Abb. 3.13). Ein speziesbedingter Unterschied in der kardialen Transduktion unterschiedlicher Serotypen kann zumindest unter ultraschallgestützter Zerstörung von AAV-beladenen Mikrosphären ausgeschlossen werden (Kap. 3.4.2., Abb. 3.13).

Eine potentielle Einschränkung des Ansatzes durch eine unspezifische Aufnahme der mit AAV beladenen Mikrosphären in die Leber konnte ausgeschlossen werden, da eine ähnliche hepatische Transduktion auch bei intravenöser Gabe von unterschiedlichen AAV – Serotypen ohne Mikrosphären beobachtet wurde (Kap. 3.4.2., Abb. 3.13). Trotz speziesbedingten Abweichungen des Tropismus der verwendeten AAV – Vektoren kristallisierte sich ein klarer Vorteil des ultraschallvermittelten Gentransfers, hinsichtlich einer Effektivitätssteigerung der Transduktion des Herzens mit Mikrosphären gegenüber systemischer Applikation ohne Ultraschall heraus.

4.2.2. Grenzen und Sicherheit des Ultraschall – vermittelten kardialen Gentransfers

Analog zu den bereits diskutierten quantitativen Analysen der Transgenexpression im Rattenherzen, konnte auch im Nachweis der Lokalisation einer AAV9 vermittelten EGFP – Reportergenexpression der Vorteil des ultraschallvermittelten Transfers

gegenüber einer rein systemischen Applikation demonstriert werden (Kap. 3.4.3, Abb. 3.14). Das dabei auftretende Transduktionmuster war gekennzeichnet durch eine vorwiegend lokale Akkumulation des Transgens in der anterioren Wand des linken Ventrikels, wie bereits mehrfach für dieses Applikationsverfahren beschrieben (Bekeredjian *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003). Als Ursache dieses Transduktionsmusters wird eine Abnahme der Schallenergie von der anterioren zur posterioren Wand des linken Ventrikels angenommen. So wird vermutet, dass die hohe Konzentration von Mikrosphären innerhalb des Lumens des linken Ventrikels einen großen Teil der Schallenergie absorbiert. Um in späteren klinischen Anwendungen eine vollständige Transduktion des Myokards zu erreichen, könnte zusätzlich zum transthorakalen Ultraschall ein transoesophagealer Ultraschall angewendet werden, welcher zusätzlich die posteriore Wand des linken Ventrikels beschallt.

Neben den zuvor diskutierten Vorteilen des ultraschallgestützten Gentransfers, könnte jedoch die Möglichkeit bestehen, dass bei der Anwendung am Herzen Komplikationen wie Hämorrhagien und Arrhythmien auftreten (Ay *et al.*, 2001; P. Li *et al.*, 2003; P. Li *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2006). Allerdings ist anzumerken, dass hochdosierte Gaben von Mikrosphären oder Ultraschallapplikationen bei eröffnetem Brustkorb keine Relevanz für klinische Anwendungen der Mikrosphären haben. Dagegen konnten Studien, deren experimentelle Applikationsparameter denen des in dieser Arbeit verwendeten Ultraschall – gestützten Gentransfers ähneln, keine nachteiligen Effekte für das Herz verzeichnen (Chen *et al.*, 2002; Bekeredjian *et al.*, 2004). Aufgrund der Tatsache, dass eine Ultraschall – vermittelte Zerstörung von AAV – beladenen Mikrosphären zum kardialen Gentransfer noch nicht untersucht wurde, war die Überprüfung möglicher Nebeneffekte essentiell. Durch histologische Analysen konnten Komplikationen wie Inflammation oder Gewebeschädigung in Folge des Gentransfers ausgeschlossen werden (Kap. 3.4.2., Abb. 3.15).

Somit stellt die Anwendung des Ultraschall - gestützten Gentransfers mit Mikrosphären nicht nur eine sichere Applikationsform dar, sondern eröffnet durch die hohe Effektivität des Gentransfers neue Möglichkeiten für zukünftige klinische Gentherapiestudien am Herzen.

4.3. Substitution des Dystrophins voller Länge durch eine verkürzte cDNA

4.3.1. Die kardiale Substitution des Dystrophins in Abhängigkeit der Vektordosis

Die Grundlage für einen erfolgreichen therapeutischen Gentransfer ist die Bioverfügbarkeit des Vektors. In diesem Zusammenhang wurde initial eine Dosiswirkungsstudie durchgeführt, die eine deutliche Abhängigkeit der Expression des μ Dys *in vivo* von der Vektordosis zeigt (Kap. 3.5.1). Die Notwendigkeit einer solchen *in vivo* – Titration wurde durch eine Studie zur Quantifizierung der Reporterexpression (LacZ) in verschiedenen Geweben nach AAV9 – Transduktion aufgezeigt (Inagaki *et al.*, 2006). Während bei niedriger Vektordosis von 1×10^{10} viralen Genomen (vG) kaum Reporteraktivität vorhanden war, konnte ein deutlicher Anstieg der Reporterexpression im Herzen nach 10 facher Vektordosiserhöhung (1×10^{11} vG) und in der Leber nach 100 facher Vektordosiserhöhung (1×10^{12} vG) verzeichnet werden. Zwar kann eine Analogie der quantitativen Erhöhung der Transgenexpression nach Vektordosiserhöhung um das 10 fache auch für die μ Dys – Expression im Herzen beobachtet werden (Kap. 3.5.2, Abb. 3.17), jedoch deckt sich die eingesetzte Vektordosis nicht mit der in der eben beschriebenen Studie. Dabei erreichten Inagaki und Kollegen eine hohe kardiale Reporterexpression bereits mit einer Vektordosis von 1×10^{11} vG, während die Expression des μ Dys im Herzen erst ab einer Vektordosis von 1×10^{12} vG zu detektieren war (Kap. 3.5.2, Abb. 3.17). Zusätzlich zur unterschiedlich starken Transgenexpression im Herzen konnte durch die fehlende Expression des μ Dys in der Leber, welche per se kein Dystrophin voller Länge exprimiert, eine weitere Differenz zu Inagaki und Kollegen beobachtet werden (Kap. 3.5.2, Abb. 3.18). Die Gründe für die offensichtlichen Unterschiede beider Studien liegen vor allem in der Verwendung verschiedener Transgene und Promotoren zur Kontrolle der Transgenexpression. Während Inagaki und Kollegen zur Dosiswirkungsstudie lediglich den CMV – Promotor (CMV) in Kombination mit der β -Galaktosidase (lacZ) einsetzten, wurde bei der Titration des μ Dys ein Vergleich des CMV – Promotors mit dem kardial spezifischen CMV verstärkten MLC0.26kb – Promotor (CMV-MLC0.26) angestrebt. Zwar konnte in der Immunfluoreszenz eine deutliche Expression des μ Dys bei beiden verwendeten Promotoren verzeichnet werden, jedoch zeigte die

kardiale Expressionsanalyse im Westernblot ein differenzierteres Bild (Kap. 3.5.2., Abb. 3.19). Grund für die im Vergleich zum CMV verstärkten MLC0.26kb – Promotor, geringere CMV vermittelte μ Dys – Expressionen ist der Einsatz unterschiedlicher Maximal – Vektordosen (CMV= $4,5 \times 10^{11}$ vG \leftrightarrow CMV-MLC0.26= 1×10^{12} vG). Gentransferstudien, bei denen das therapeutische μ Dys in Kombination mit dem CMV – Promotor in einer Vektordosis von $\geq 1 \times 10^{12}$ vG systemisch appliziert wurde (Tabelle 4.1), konnten mit diesem Konstrukt eine Transgenexpression im gesamten Herzen erreichen (Gregorevic *et al.*, 2006; Townsend *et al.*, 2007; Bostick *et al.*, 2008). Die in diesen Arbeiten stete Verwendung einer hohen Vektordosis zum systemischen μ Dys - Transfer lässt somit darauf schließen, dass eine geringfügige Reduktion der applizierten Vektordosis zur erheblichen Abnahme der Transgenexpression im Herzen führt. Auch der in einer Reportergenstudie verzeichnete, sprunghafte Anstieg der Expression nach Verzehnfachung der Vektordosis (AAV9: 1×10^{10} vG auf 1×10^{11} vG) bestätigt ebenfalls das vorhandene Verhältnis zwischen Vektordosis und Reportergenexpression (Inagaki *et al.*, 2006). Aufgrund der Effektivität der in der Literatur beschriebenen Gentransferansätze (Tabelle 4.1) und den Befunden dieser Arbeit ist eine AAV – Vektordosis von $\geq 1 \times 10^{12}$ vG optimal, um eine transmurale kardiale Expression des μ Dys unter Kontrolle des verwendeten herzspezifischen Promotors zu garantieren.

Vektordosis bei systemischer Applikation im Maus – Modell			
Vektor	Transgen	Vektordosis	Literatur
AAV9	β -Galaktosidase	1×10^{10} vG bis $1,8 \times 10^{12}$ vG	(Inagaki <i>et al.</i> , 2006)
	μ Dystrophin	1×10^{12} vG	(Bostick <i>et al.</i> , 2008)
	μ Dystrophin	1×10^{11} vG bis 1×10^{12} vG	In dieser Arbeit, Kap. 3.5.2.
AAV8	β -Galaktosidase	1×10^{10} vG bis $1,8 \times 10^{12}$ vG	(Inagaki <i>et al.</i> , 2006)
AAV6	μ Dystrophin	1×10^{12} vG	(Townsend <i>et al.</i> , 2007)
	μ Dystrophin	3×10^{12} vG	(Gregorevic <i>et al.</i> , 2006)

Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten Vektordosen bei systemischer Applikation von AAV – Vektoren im Maus – Modell.

4.3.2. Unvollständige Substitution des Dystrophins im Skelettmuskel

Wie in Kapitel 4.3.1.bereits beschrieben führt AAV9-CMV- μ Dys (CMV- μ Dys) bzw. AAV9-CMV-MLC0.26kb- μ Dys (CMV-MLC0.26- μ Dys) bei einer hohen Vektordosis zu einer effektiven Expression des Transgens im Herzen von Mdx - Mäusen. Die hierbei

fehlende Expression des μ Dystrophin im Skelettmuskel (Kap. 3.5.2., Abb. 3.17) steht damit im Gegensatz zu den bereits veröffentlichten Studien (Fabb *et al.*, 2002; Harper *et al.*, 2002; Gregorevic *et al.*, 2006; Bostick *et al.*, 2008). Jedoch besteht die Möglichkeit, dass sowohl der AAV – Vektor, als auch das Transgen eine Immunantwort provozieren (Hartigan-O'Connor *et al.*, 2001; Yuasa *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007; Yuasa *et al.*, 2007; Mays *et al.*, 2009). Durch Infiltration des transduzierten Gewebes mit $CD4^+$ und $CD8^+$ T – Lymphozyten kommt es zur Eliminierung des AAV-Vektors und der entsprechend transduzierten Zellen (Hartigan-O'Connor *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007; Mays *et al.*, 2009). Hinweise, nach denen bestimmte AAV - Serotypen (z. B. AAV2) eine Prädisposition zur Aktivierung einer T – Zell vermittelten Immunantwort zeigen (C. Li *et al.*, 2007; Mays *et al.*, 2009), konnten in dieser Arbeit für AAV9 nicht bestätigt werden (Kap. 3.5.4., Abb. 3.21). Eine Arbeit an Hunden, denen ein humanes μ Dys appliziert wurde, legt nahe, dass ein μ Dys per se immunogen sein könnte (Wang *et al.*, 2007). Dies konnte jedoch durch die fehlende Invasion des Muskels mit $CD4^+$ und $CD8^+$ T – Zellen nach systemischer Vektorapplikation für die Mdx – Maus entkräftet werden (Kap. 3.5.4., Abb. 3.21). Auch die These, dass der immunologische Grundstatus der Mdx – Maus (Kap. 1.4.2.) zu einer erhöhten Antigenpräsentation und folglich zu einer Immunantwort auf das Transgen führt (Yuasa *et al.*, 2002), fand in dieser Arbeit keine Bestätigung (Kap. 3.5.4., Abb. 3.21). Insgesamt scheint die geringe μ Dys – Expression nach AAV9 – vermitteltem systemischen Gentransfer in Mdx – Mäusen nicht durch eine immunologische Interferenz verursacht zu werden. Dies könnte somit den Verdacht aufkommen lassen, dass die Zusammensetzung des μ Dys einen Einfluß auf die Stärke und Lokalisation der Expression haben könnte. Zwar ähnelt das hier verwendete μ Dys – Konstrukt den bereits erfolgreich getesteten Konstrukten (Fabb *et al.*, 2002; Harper *et al.*, 2002; Gregorevic *et al.*, 2006; Bostick *et al.*, 2008), die Unterschiede liegen jedoch im Ausmaß der Deletionen in Stabregion und C - Terminus (Kap. 1.1.1.). Aufgrund einer vorangegangenen Arbeit, welche eine erfolgreiche Transduktion des Skelettmuskels mit dem in dieser Arbeit verwendeten μ Dys beschrieb (Jorgensen *et al.*, 2009), kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die gewählte Deletion in der Stabregion keinen Einfluß auf die Expression des μ Dys *in vivo* hat. Auch der AAV - Vektor selbst kann als Ursache der verringerten Expression ausgeschlossen werden, da eine erfolgreiche murine Skelettmuskeltransduktion von AAV9 bereits beschrieben wurde (Kap. 4.1.1.).

Dagegen könnte die transkriptionelle Regulation durch den verwendeten Promotor einen weiteren Ansatzpunkt bieten, um den Expressionsverlust des μ Dys im Skelettmuskel zu erklären. Wie jedoch aus vorangegangenen Arbeiten bekannt ist, lässt der kardiale CMV-MLC0.26kb – Promotor eine unspezifische Reportergenexpression in Leber und Skelettmuskel zu (Kap. 3.3.3., Abb 3.9) (Müller *et al.*, 2006). Entgegen dieser Erwartung wurde eine im Vergleich zum Herzen geringe μ Dys - Expression im Skelettmuskel für die Kombination aus AAV9 und MLC0.26- μ Dys beobachtet werden (Kap. 3.5.2., Abb. 3.17 und 3.19). Die Spezifität des AAV9-CMV-MLC0.26- μ Dys – Vektors zeigt sich zudem im Vergleich der Expressionen zu AAV9-CMV- μ Dys, dessen Expressionsstärke zwischen Herz – und Skelettmuskel nur einen marginalen Unterschied aufweist (Kap. 3.5.2., Abb. 3.19). Zwar fällt die Expression des μ Dys unter Verwendung des CMV – Promotors im Vergleich zu anderen Arbeiten geringer aus (Kap. 3.5.2., Abb. 3.17) (Yoshimura *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Gregorevic *et al.*, 2006; Townsend *et al.*, 2007; Bostick *et al.*, 2008), dies kann jedoch auf den Unterschied der verwendeten Vektordosen zurückgeführt werden (Kap. 4.3.1., Tabelle 4.1). Aufgrund der durchgeführten Analysen lässt sich schlussfolgern, dass die Kombination aus AAV9-CMV-MLC0.26kb- μ Dys zu einer spezifischen Expression des Konstruktes im Herzen, bei gleichzeitig geringer Expression im Skelettmuskel und abwesender Expression in der Leber führt. Somit eröffnet diese Studie neue Möglichkeiten im Hinblick auf eine spezifischere Gentherapie des Herzmuskels bei DMD.

4.3.3. Die Substitution des Dystrophins in Abhängigkeit vom Alter

Ein erfolgreicher therapeutischer Gentransfer sollte zusätzlich zur Bioverfügbarkeit des Vektors auch eine Unabhängigkeit des Transfers vom Alter des Zielorganismus garantieren. Aus diesem Grund wurde in einem Initialversuch eruiert, ob eine μ Dys – Expression nach systemischer Applikation des AAV9-MLC0.26- μ Dys in älteren Mdx – Mäusen nachweisbar ist. Zwar konnte durch den visuellen Nachweis einer kardialen μ Dys – Expression in allen verwendeten Altersklassen (Kap. 3.5.5., Abb. 3.22) ein Konsensus zur Literatur geschaffen werden (Bostick *et al.*, 2007), jedoch unterscheiden sich die Studien erheblich voneinander. Während Bostick und Kollegen (2007) mittels Reportergen einen Vergleich zwischen neonatalen und adulten Tieren anstrebten, wurden in dieser Arbeit AAV9- μ Dys injizierte Jungtiere (6 Wochen) mit alten adulten Tieren verglichen (42 Wochen). Ein weiterer erheblicher

Unterschied ist die Varianz der Vektordosis bei Bostick und Kollegen. So wurden neonatale Mdx - Mäuse mit einer ca. 6 fach höheren Vektordosis injiziert als adulte Tiere. Hingegen erreichte die in dieser Arbeit durchgeführte Studie eine hohe kardiale Expression bei unveränderter Vektordosis. Interessanterweise wurde trotz der vielen Unterschiede beider Studien eine vergleichbare Transgenexpression im Herzen bei verschiedenen Altersklassen von Mäusen erzielt. Besonders durch Studien zum therapeutischen μ Dys – Transfer in den Herzmuskel von Mdx - Mäusen (Yue *et al.*, 2003; Townsend *et al.*, 2007; Bostick *et al.*, 2008), welcher sowohl bei Vektorapplikation in neonatalen, als auch in adulten Tieren erfolgreich war, kann geschlussfolgert werden, dass die kardiale Transduktion des μ Dys in Mdx - Mäusen nicht vom Alter der Tiere abhängt.

Dagegen zeigte sich für den Gentransfer in den Skelettmuske ein Einfluß des Alters (Yoshimura *et al.*, 2004). Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass sich die Transduktionseffizienz des Skelettmuskels mit zunehmendem Alter der Mdx - Maus erhöht, die funktionelle Rekonstitution aber bei Injektion in neonatale Tiere am höchsten ist (Yoshimura *et al.*, 2004). Anders als bei Yoshimura und Kollegen (2004) wurden jedoch in der vorliegenden Arbeit Jungtiere und keine Neugeborenen mit alten adulten Tieren hinsichtlich einer μ Dys – Expression im Skelettmuskel verglichen (Kap. 3.5.5., Abb. 3.22), was die Vergleichbarkeit beider Studien einschränkt. Dennoch ist in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein Trend hinsichtlich einer altersabhängigen Skelettmuskeltransduktion zu erkennen. Allerdings ist anzumerken, dass im Gegensatz zu Angaben in der Literatur (Liu *et al.*, 2005; Gregorevic *et al.*, 2006; Rodino-Klapac *et al.*, 2007; Jorgensen *et al.*, 2009), welche eine erfolgreiche Transduktion des Skelettmuskels bei unterschiedlichsten Altersklassen der Mdx – Mäuse beschreiben, in dieser Arbeit generell eine niedrigere Transduktion für den Skelettmuskel beobachtet wurde (Kap. 3.5.5., Abb. 3.22). Grund für diesen Unterschied ist die im Vergleich zu anderen μ Dys – Ansätzen geringere Rekonstitutionseffizienz des bereits beschriebenen und hier verwendeten μ Dys für den Skelettmuskel (Jorgensen *et al.*, 2009). Für eine genauere Analyse der Alterabhängigkeit einer Skelettmuskeltransduktion bei systemischer Applikation des in dieser Arbeit verwendeten μ Dys sind aufgrund der zu geringen Anzahl der in dieser Pilotstudie verwendeten Tiere weitere Untersuchungen notwendig.

4.4. Charakterisierung des vorliegenden DMD^{mdx} – Stammes: genotypische und phänotypische Unterschiede zum Ursprungsstamm

4.4.1. Phänotypische und genotypische Gegenüberstellung

Als Modell einer genetisch bedingten dilatativen Kardiomyopathie (DCM), spielt die Duchenne Muskeldystrophie – Maus (Mdx) in der Untersuchung therapeutischer Gentransferansätze eine wichtige Rolle. Aufgrund der phänotypischen Unterschiede, bezüglich Fell – und Augenfarbe (Kap. 3.1.1.), des in dieser Arbeit verwendeten Mausstammes (C57BL/10ScSn-129SVJ) zum kommerziell erhältlichen Originalstamm der Mdx – Maus (C57BL/10ScSn-DMD^{mdx}; www.jax.org) kam der Verdacht auf, dass sich beide Stämme hinsichtlich ihres genetischen Profils zu sehr unterscheiden könnten um die Effektivität eines kardialen Gentransfers im globalen Zusammenhang bewerten zu können. Da der Originalstamm der Mdx – Maus nachweislich aus C57Bl/10J – Mäusen hervorgegangen ist ((Bulfield *et al.*, 1984)www.jax.org), wurde dieser Wildtyp – Stamm für eine Gegenüberstellung des genetischen Hintergrundes mit der in dieser Arbeit verwendeten Mdx – Maus herangezogen (Kap. 3.1.1.). Von besonderer Bedeutung war dabei das X – Chromosom, welches die Ursächliche Punktmutation trägt (Bulfield *et al.*, 1984). Der Vergleich des verwendeten Mdx – Stammes mit der C57Bl/10J zeigte zwar eine genomweite Abweichung von 24,79% gegenüber der Mdx – Linie, jedoch ist diese auf die Autosomen beschränkt (Kap. 3.1.1.). Die 100% ige Übereinstimmung des X – chromosomalen genetischen Hintergrundes beider Linien lässt somit den Schluss zu, dass eine Vergleichbarkeit der Mdx - Modelle möglich ist. Das entscheidende genetische Merkmal der bisher publizierten Mdx – Linie ist jedoch die homozygote X - chromosomale Punktmutation, welche zur Entstehung eines frühzeitigen Stopkodons im Exon 23 des Dystrophingens führt und somit den Verlust des Dystrophins voller Länge bedingt (Bulfield *et al.*, 1984). Für die in dieser Arbeit verwendete Mdx – Linie ist durch frühere Arbeiten bekannt, dass aus histologischer und funktioneller Sicht kein Dystrophin im Skelettmuskel vorhanden sein sollte (Friedrich *et al.*, 2004). Jedoch konnten diese Annahme erst durch eine genauere Genotypisierung, hinsichtlich der in Exon 23 zu findenden Punktmutation bestätigt werden (Kap. 3.1.). Die Ergebnisse dieser Genotypisierung belegen eindeutig den für die Original – Mdx – Maus typischen (Bulfield *et al.*, 1984) Basenaustausch von C > T an Position 28 des Exon 23.

So konnte auf genetischer Ebene eindeutig gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit verwendete Mdx – Linie hinsichtlich der Mutation im Dystrophingen und des genetischen Hintergrundes des X – Chromosoms mit der Original – Mdx – Linie vergleichbar ist.

4.4.2. Histopathologische Gegenüberstellung

Im initialen Schritt der Verifizierung des für den Phänotyp essentiellen genetischen Profils konnte bereits auf dieser Ebene eine Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit verwendeten Mdx – Linie mit der Original – Mdx – Linie erzielt werden. Da der Erfolg therapeutischer Gentransferansätze primär an der Veränderung histologischer Parameter gemessen wird, war es von essentieller Bedeutung deren Ausprägung im Vorfeld zu bestimmen. So konnten, in Bezug auf die altersabhängige Diversität von Nekrose und Regeneration im Skelettmuskel, die in der Literatur beschriebenen Befunde bestätigt werden (Bulfield *et al.*, 1984; Dangain and Vrbova, 1984; Bridges, 1986; Karpati *et al.*, 1988). Analog zur Literatur ist bei 8 Wochen alten männlichen Mdx - Tieren bereits eine erhöhte Anzahl regenerierender Muskelfasern zu verzeichnen (Kap. 3.2.1., Abb. 3.3) (Bulfield *et al.*, 1984; Torres and Duchon, 1987; Karpati *et al.*, 1988), während nekrotische Fasern nur vereinzelt oder gar nicht vorkommen (Kap. 3.2.1., Abb. 3.3) (Bulfield *et al.*, 1984; Karpati *et al.*, 1988). Auch die progressiv verlaufende Skelettmuskelnekrose, welche ab der 12. Woche einen sprunghaften Anstieg verzeichnet (Torres and Duchon, 1987; Roig *et al.*, 2004), ist in dieser Arbeit in der 16. Lebenswoche der Mdx - Maus deutlich ausgeprägt (Kap. 3.2.1., Abb. 3.3). Allerdings ist den histopathologischen Untersuchungen der Mdx – Mäuse dieser Arbeit hinzuzufügen, dass Nekrosen und Fibrosen im Skelettmuskel ab der 16. Lebenswoche sehr heterogen ausgeprägt waren (Kap. 3.2.1., Abb. 3.3). Grund für diese Diskrepanz kann die Wahl des zu untersuchenden Skelettmuskels sein (Tabelle 4.2). So verdeutlicht besonders eine Arbeit, dass das pathologische Profil verschiedener Muskeln, in diesem Fall dem des *Musculus tibialis anterior* und des *Musculus soleus*, der Mdx – Mäuse stark voneinander abweichen kann (Dangain and Vrbova, 1984). Für zukünftige Untersuchungen wäre es angebracht, einen altersabhängigen Vergleich verschiedener Muskelgruppen unterschiedlicher Mdx – Stämme vorzunehmen, um eine präzisere Aussage über den pathologischen Verlauf der Skelettmuskeldystrophie treffen zu können. Trotz der eben beschriebenen Diskrepanzen ist jedoch eine Grundübereinstimmung in der Ausprägung des

sklettmuskulären histopathologischen Phänotyps des in dieser Arbeit verwendeten Mdx – Stammes mit den in der Literatur verwendeten Mdx – Stämmen zu erkennen. Bei Betrachtung des altersabhängigen histopathologischen Verlaufes der kardialen Muskeldystrophie des in dieser Arbeit verwendeten Mdx – Stammes fällt besonders ein Unterschied zu den in der Literatur verwendeten Mdx – Mäusen auf. Dabei konnten die von Bridges und Kollegen beschrieben ausgeprägten nekrotischen und regenerativen Areale in 8 Wochen alten Mdx - Herzen (Bridges, 1986) für den in dieser Arbeit verwendeten Stamm nur bedingt bestätigt werden. Allerdings ist anzumerken, dass Bridges und Kollegen histopathologische Veränderungen nur bei einem der beiden untersuchten Tiere feststellen konnten, während bei allen 3 der in dieser Arbeit untersuchten Mdx – Mäusen kaum bzw. keine Auffälligkeiten des Gewebes vorlagen (Kap. 3.2.1., Abb. 3.2). Hingegen decken sich die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten histopathologischen Untersuchungen bei 8 Wochen alten Tieren mit denen einer anderen Studie, worin bei Mäusen im Alter von 6 bis 16 Wochen nur vereinzelt Nekrosen beobachtet werden konnten (Cohn *et al.*, 2007). Die Vergleichbarkeit der histopathologischen Befunde zwischen Cohn und Kollegen (2007) bzw. Bridges und Kollegen (1986), welche einen reinen C57Bl/6 bzw. C57Bl/10 Mdx - Stamm untersuchten, und der hier vorgelegten Arbeit deuten darauf hin, dass der genetische Hintergrund einer Mdx - Maus für die Ausprägung der kardialen Pathologie im Alter von 6 – 16 Wochen nicht ausschlaggebend ist, sondern eher das Ergebnis methodischer Differenzen darstellt. Allerdings konnte zwischen neueren Arbeiten und den Ergebnissen dieser Studie ein Konsensus hinsichtlich der Beschreibung einer progressiven Fibrose im Herzen von Mdx – Mäusen geschaffen werden (Kap. 3.2.1., Abb. 3.2) (Quinlan *et al.*, 2004; Cohn *et al.*, 2007; Spurney *et al.*, 2008).

Zusammenstellung pathologischer Untersuchungen an männlichen Mdx - Mäusen

Literatur	Alter	Muskel	Nekrose	Regeneration	Inflammation	Färbung
(Dangain and Vrbova, 1984)	2-3 Wo	Tibialis anterior	-	-	Phagozyten	HE, v.G.
	3-4 Wo		+++	-	n.d.	
	4-6 Wo		-	+++	n.d.	
	30 Wo	Tibialis anterior / M. Soleus	-/+++	+++/+	Phagozyten	
(Bulfield <i>et al.</i>, 1984)	3 Wo	M. Soleus und M. gastrocnemicus	++	++	Makrophagen, Basophile und Neutrophile	HE, EM
	5 Wo		+++	+++	+, s.o.	

		9 Wo		+	+++	+, s.o.	
		12 Mon		+++	n.d.	+, s.o. Fetteinlagerung	
(Bridges, 1986)		8 Wo	Gliedermuskulatur / Herz	++/++	++/++	Makrophagen, Basophile und Neutrophile	HE
		10 Wo		-/-	-/-	n.d.	
		12 Wo		++/-	++/-	++/n.d.	
		20 Wo		++/++	++/++	++/++	
		30 Wo		++/++	++/++	++/++ Myokarditis (mit Lymphozyten)	
(Karpati et al., 1988)	et	<2 Wo	Gliedermuskulatur	-	-	n.d.	HE
		>2 Wo		++	-	Phagozyten	
		6 Wo		+++	++	n.d.	
		8 Wo		++	+++	n.d.	
		12 Mon		+	+++	n.d.	

Tabelle 4.2: Zusammenstellung histopathologischer Untersuchungen bei männlichen Mdx – Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten. HE= Hämatoxylin Eosin, v.G.= van Gieson, EM= Elektronenmikroskopie, Wo= Wochen, Mon= Monate

Einen weiteren Aspekt bei Betrachtung der progredienten Muskeldystrophie bei Mdx – Mäusen stellt die Inflammation der Muskulatur dar, welche einen erheblichen Einfluß auf die Ausprägung der histopathologischen Parameter nimmt (Kap. 1.2.4.). Dabei beschreiben die meisten der bereits veröffentlichten Studien eine permanente Infiltration des nekrotischen Muskelgewebes mit basophilen / eosinophilen Granulozyten und Makrophagen, sowie eine erhöhte Anzahl von CD4⁺ - T – Zellen im Gewebe (Bulfield *et al.*, 1984; Dangain and Vrbova, 1984; Bridges, 1986; Torres and Duchon, 1987; Hartigan-O'Connor *et al.*, 2001). Die in dieser Studie fehlende Infiltration des Herz – und Skelettmuskels mit eben genannten Zellen des Immunsystems steht folglich im kompletten Gegensatz zu den eben genannten Veröffentlichungen (Kap. 3.2.2., Abb. 3.4 und 3.5). Die genauere Betrachtung der Analysen zur Makrophageninfiltration zeigt, dass sich die Aussagen ausschließlich auf histologische HE – Färbungen stützen (Tabelle 4.2). Da sich Muskelquerschnitte mit nekrotischen und teilweise regenerierenden Fasern nach HE – Färbung als stark multimorph präsentieren, lässt sich eine Makrophageninfiltration auf diese Art und Weise nur bedingt untersuchen.

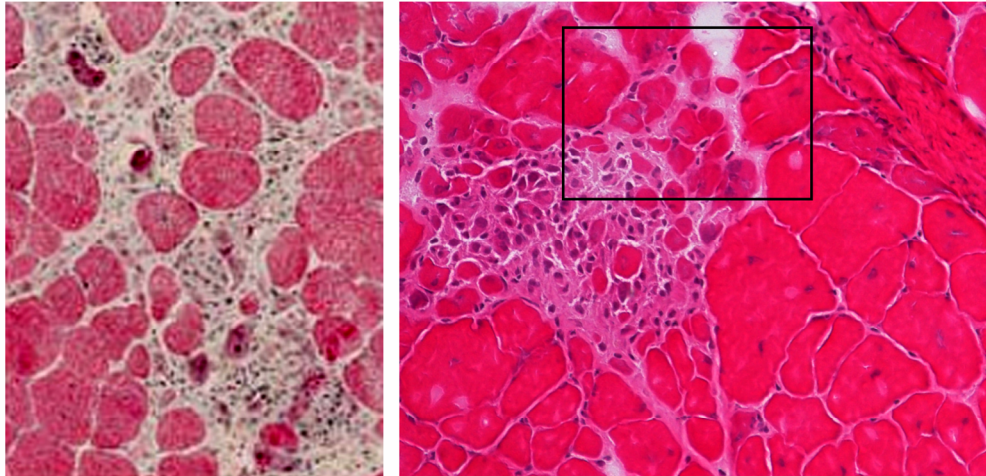


Abbildung 4.1: Histopathologische Gegenüberstellung. Dargestellt sind die HE – Färbungen des *Musculus tibialis anterior* von Hartigan-O'Connor und Kollegen (2001) (links) und des für diese Arbeit verwendeten *Musculus quadriceps femoris* (rechts). Die zu Hartigan-O'Connor ähnlichen Areale des *Musculus quadriceps femoris* wurden durch eine Umrandung hervorgehoben (Rechteck).

Zwar gibt es hinsichtlich der histologischen Morphologie Übereinstimmungen mit den in dieser Arbeit präsentierten Daten (Abb. 4.1), jedoch konnte nach Verwendung einer spezifischen immunhistochemischen Makrophagendetektion kein positives Ergebnis für den Herz – und Skelettmuskel in unserer Mdx – Maus gezeigt werden (Kap. 3.2.2., Abb. 3.4 und 3.5). Dies steht im Kontrast zu einer Studie, welche eine erhöhte Präsenz an Makrophagen und $CD4^{+}$ - T – Zellen im *Musculus tibialis anterior* bei Mdx – Mäusen verschiedener Altersstufen im Vergleich zu C57BL/10 beschreibt. (Hartigan-O'Connor *et al.*, 2001). Im direkten Vergleich der hier vorgelegten Arbeit mit der eben erwähnten Studie fällt vor allem die Verwendung unterschiedlicher Methoden auf. Während Hartigan-O'Connor und Kollegen (2001) mittels Durchflusszytometrie (FACS= fluorescence activated cell sorting) den gesamten Querschnitt für eine präzise Aussage zur Infiltration des Muskels zur Verfügung hatten, beschränkt sich die hier vorgelegte Arbeit auf immunhistologische Ausschnittsaufnahmen (Kap. 3.2.2., Abb. 3.5), welche nicht den Muskels als Ganzes repräsentiert. Wie bereits beschrieben, spielt die Wahl des zu untersuchenden Muskels in der Untersuchung von Nekrose und Regeneration eine erhebliche Rolle (Dangain and Vrbova, 1984). Ebenso ist es denkbar, dass die Verwendung unterschiedlicher Muskeln, *Musculus tibialis anterior* bei Hartigan-O'Connor und Kollegen und *Musculus quadriceps femoris* in der hier vorgelegten Arbeit das Ergebnis wesentlich beeinflusst.

Auch wenn die Ergebnisse des in dieser Arbeit charakterisierten Mdx – Stammes hinsichtlich der permanenten Infiltration von Zellen des Immunsystems im Muskel, von denen des Mdx – Originalstammes abweichen, so besteht auf histopathologischer Ebene vor allem für das Herz eine Übereinstimmung zur Literatur.

4.4.3. Physiologische Parameter

Neben den histopathologischen Veränderungen stellen Veränderungen physiologischer Parameter, wie die der Kreatinkinase, des kardialen Troponin T (kTnT) oder der echokardiographisch messbaren Veränderung der Herzfunktion, einen weiteren wichtigen Indikator zur Evaluation des Erfolges therapeutischer Gentransferansätze bei Mdx - Mäusen dar. In Übereinstimmung zu bereits veröffentlichten Daten konnte ein erhöhter Blutspiegel an Kreatinkinase in allen Altersgruppen nachgewiesen werden (Kap. 3.2.3., Abb. 3.6) (Glesby *et al.*, 1988). Dagegen erwies sich in der hier vorgelegten Studie der Blutspiegel bei Tieren im Alter zwischen 20 und 40 Wochen als rückläufig (Kap. 3.2.3., Abb. 3.6). Ob dieses Phänomen durch die altersabhängige Abnahme der Muskelmasse per se oder durch die Abnahme an Nekrosen und zunehmende Muskelregeneration (Kap. 4.4.2., Tab. 4.2) zu begründen ist, bleibt unklar.

Da der Gehalt der Kreatinkinase im Blut lediglich ein Indikator der gesamten Muskelschädigung ist, aber keine spezifische Aussage über das Ausmaß an Herzmuskelschädigung ermöglicht, erfolgte die Bestimmung des herzspezifischen Nekroseparameters Troponin T im Blut. Da die Bestimmung des kardialen Troponin T im Blut von Patienten zur Diagnose eines Myokardinfarktes dient (Bassand *et al.*, 2007), galt es zu klären, ob eine Bestimmung dieses Herzinsuffizienzmarker aus Blutproben von Mdx – Mäusen ebenfalls möglich ist. Hinweise, nach denen das kTnT aus dystrophindefizienten Kardiomyozyten freigesetzt wird (Turk *et al.*, 2006), ließ sich in Blutproben unserer Mdx – Tiere nicht bestätigen (Kap. 3.2.3., Abb. 3.6). So besteht weder zwischen Mdx – Mäusen unterschiedlicher Altersgruppen, noch zwischen Mdx – Mäusen und Wildtyp – Tieren ein signifikanter Unterschied. Bei genauerer Betrachtung der Daten fallen hohe interindividuelle Unterschiede zwischen in den einzelnen Gruppen auf, welche insbesondere bei Mdx – Mäusen im Alter von 20 Wochen stark ausgeprägt sind (Kap. 3.2.3., Abb. 3.6).

Die echokardiographischen Normalbefunde in 65 Wochen alten Mdx – Mäusen (Kap. 3.2.4.) sind nicht identisch zu der publizierten kardialen Funktionsveränderung bei Tieren im Alter von über 40 Wochen (Quinlan *et al.*, 2004; Spurney *et al.*, 2008). Dabei ist anzumerken, dass beide Studien zwar Veränderungen der kardialen Funktion bei Mdx - Mäusen *in vivo* zeigen, diese trotz frühzeitig auftretender histopathologischer Veränderungen im Herzen aber nur diskret ausfallen. Damit besteht die Möglichkeit, dass diese Veränderungen nicht - invasiven Messmethoden wie der transthorakalen Echokardiographie unter Umständen entgehen können.

4.5. Fazit

Das für diese Arbeit verfügbare Tiermodell der Duchenne Muskeldystrophie (Mdx - Maus) konnte genotypisch und phänotypisch mit der kommerziell erhältlichen DMD^{mdx} – Maus verglichen werden. Die in dieser Arbeit verwendete Mdx – Maus zeigt zwar genotypische Abweichungen von der kommerziell erhältlichen Maus, jedoch konnten histopathologisch keine Divergenzen zu den in der Literatur verfügbaren Daten festgestellt werden. Abweichungen hingegen traten in der Ausprägung der Kardiomyopathie beider Stämme auf. So konnten die in der Literatur beschriebene physiologisch messbare Veränderung der Herzfunktion für den hier verfügbaren Stamm nicht bestätigt werden. Dies könnte möglicherweise auf die geringe Sensitivität der in dieser Arbeit eingesetzten nicht – invasiven Messmethode des transthorakalen Ultraschalls zurückzuführen sein. Um genauere Aussagen über die Ausprägung der Kardiomyopathie des verfügbaren Mdx – Stammes zu treffen, wäre ein direkter Vergleich beider Mauslinien unter gleichen Bedingungen notwendig. Die Verwendung dieser Mdx - Maus in Gentransferstudien bleibt aufgrund der histopathologischen Befunde jedoch weiterhin möglich.

Durch die Kombination aus herzmuskelspezifischem Promotor (CMV-MLC1.5kb) und Adeno-assoziierten viralen Vektoren des Serotyp 9 (AAV9) konnte eine effizientere und spezifischere kardiale Transduktion gegenüber herkömmlichen AAV9 – Vektoren mit unspezifischem Promotor erreicht werden. Speziell die Verwendung einer verkürzten Version des kardial spezifischen Promotors (CMV-ML0.26kb) in sogenannten Doppelstrangvektoren zeigte selbst bei hoher Vektordosis eine effiziente Expression im Myokard im Vergleich zu anderen Organen. Dies stellte die Grundlage für weiterführende Therapieansätze des Myokards im Tiermodell dar.

Die Verwendung des transkriptionell zielgerichteten AAV9 für den Transfer einer verkürzten Dystrophin – cDNA (μ Dys) in das Herz einer Dystrophin defizienten Maus (Mdx) führte im Vergleich zum transkriptionell ungerichteten AAV9 zu einer weitgehend auf den Herzmuskel beschränkten Expression des μ Dys. Somit eröffnet der kardial spezifische Promotor in Kombination mit AAV9 neue Möglichkeiten in der Evaluation von Therapieansätzen einer Muskeldystrophie – assoziierten Kardiomyopathie im Mausmodell.

Die Untersuchung einer Ultraschall – vermittelten Zerstörung von Mikrosphären mit transkriptionell und transduktionell zielgerichteten AAV – Vektoren in der Ratte zeigte im Vergleich zur systemischen Applikation eine erhöhte Transduktionrate des Herzens. Da die Anwendung der Mikrosphären in größeren Tieren und Menschen als unbedenklich gilt, könnte diese Form der Applikation für einen AAV – basierten kardialen Gentransfer im Menschen genutzt werden.

Somit wurde sowohl auf transkriptioneller, transduktioneller und applikativer Ebene ein effizienter Gentransfer für das Herz etabliert und durch einen therapeutischen Transfer in ein Mausmodell mit genetisch bedingter Kardiomyopathie erfolgreich getestet. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für die Optimierung therapeutischer Studien in herzinsuffizienten Mausmodellen und besitzen darüber hinaus das Potential, humane Gentherapien des Herzens zu ermöglichen.

5. Literaturverzeichnis

- Akache B., Grimm D., Pandey K., Yant S.R., Xu H., Kay M.A. (2006) The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol* 80:9831-9836.
- Ambrosio C.E., Valadares M.C., Zucconi E., Cabral R., Pearson P.L., Gaiad T.P., Canovas M., Vainzof M., Miglino M.A., Zatz M. (2008) Ringo, a Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog with absent dystrophin but normal strength. *Neuromuscul Disord* 18:892-893.
- Anderson J.E., Ovalle W.K., Bressler B.H. (1987) Electron microscopic and autoradiographic characterization of hindlimb muscle regeneration in the mdx mouse. *Anat Rec* 219:243-257.
- Angelini C., Pegoraro E., Turella E., Intino M.T., Pini A., Costa C. (1994) Deflazacort in Duchenne dystrophy: study of long-term effect. *Muscle Nerve* 17:386-391.
- Araki E., Nakamura K., Nakao K., Kameya S., Kobayashi O., Nonaka I., Kobayashi T., Katsuki M. (1997) Targeted disruption of exon 52 in the mouse dystrophin gene induced muscle degeneration similar to that observed in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 238:492-497.
- Arruda V.R., Schuettrumpf J., Herzog R.W., Nichols T.C., Robinson N., Lotfi Y., Mingozi F., Xiao W., Couto L.B., High K.A. (2004) Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood* 103:85-92.
- Atchison R.W., Casto B.C., Hammon W.M. (1965) Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149:754-756.
- Auricchio A., O'Connor E., Weiner D., Gao G.P., Hildinger M., Wang L., Calcedo R., Wilson J.M. (2002) Noninvasive gene transfer to the lung for systemic delivery of therapeutic proteins. *J Clin Invest* 110:499-504.
- Ay T., Havaux X., Van Camp G., Campanelli B., Gisellu G., Pasquet A., Denef J.F., Melin J.A., Vanoverschelde J.L. (2001) Destruction of contrast microbubbles by ultrasound: effects on myocardial function, coronary perfusion pressure, and microvascular integrity. *Circulation* 104:461-466.
- Bartlett J.S., Wilcher R., Samulski R.J. (2000) Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 74:2777-2785.
- Barton E.R., Morris L., Musaro A., Rosenthal N., Sweeney H.L. (2002) Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol* 157:137-148.
- Bassand J.P., Hamm C.W., Ardissino D., Boersma E., Budaj A., Fernandez-Aviles F., Fox K.A., Hasdai D., Ohman E.M., Wallentin L., Wijns W. (2007) Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 28:1598-1660.
- Bauer R., Straub V., Blain A., Bushby K., MacGowan G.A. (2009) Contrasting effects of steroids and angiotensin-converting-enzyme inhibitors in a mouse model of dystrophin-deficient cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 11:463-471.
- Becerra S.P., Koczot F., Fabisch P., Rose J.A. (1988) Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. *J Virol* 62:2745-2754.
- Bekeredjian R., Chen S., Frenkel P.A., Grayburn P.A., Shohet R.V. (2003) Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart. *Circulation* 108:1022-1026.
- Bekeredjian R., Chen S., Pan W., Grayburn P.A., Shohet R.V. (2004) Effects of ultrasound-targeted microbubble destruction on cardiac gene expression. *Ultrasound Med Biol* 30:539-543.
- Bekeredjian R., Grayburn P.A., Shohet R.V. (2005) Use of ultrasound contrast agents for gene or drug delivery in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 45:329-335.
- Berns K.I., Pinkerton T.C., Thomas G.F., Hoggan M.D. (1975) Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 68:556-560.
- Bia B.L., Cassidy P.J., Young M.E., Rafael J.A., Leighton B., Davies K.E., Radda G.K., Clarke K. (1999) Decreased myocardial nNOS, increased iNOS and abnormal ECGs in mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Cell Cardiol* 31:1857-1862.
- Biggar W.D., Gingras M., Fehlings D.L., Harris V.A., Steele C.A. (2001) Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr* 138:45-50.

- Biggar W.D., Harris V.A., Eliasoph L., Alman B. (2006) Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscul Disord* 16:249-255.
- Billard C., Gillet P., Barthez M., Hommet C., Bertrand P. (1998) Reading ability and processing in Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Dev Med Child Neurol* 40:12-20.
- Bish L.T., Morine K., Sleeper M.M., Sanmiguel J., Wu D., Gao G., Wilson J.M., Sweeney H.L. (2008) Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the mouse and rat. *Hum Gene Ther* 19:1359-1368.
- Blacklow N.R., Hoggan M.D., Rowe W.P. (1968) Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *J Natl Cancer Inst* 40:319-327.
- Blacklow N.R., Hoggan M.D., Sereno M.S., Brandt C.D., Kim H.W., Parrott R.H., Chanock R.M. (1971) A seroepidemiologic study of adenovirus-associated virus infection in infants and children. *Am J Epidemiol* 94:359-366.
- Blankinship M.J., Gregorevic P., Allen J.M., Harper S.Q., Harper H., Halbert C.L., Miller A.D., Chamberlain J.S. (2004) Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther* 10:671-678.
- Boekstegers P., von Degenfeld G., Giehl W., Heinrich D., Hullin R., Kupatt C., Steinbeck G., Baretton G., Middeler G., Katus H., Franz W.M. (2000) Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins. *Gene Ther* 7:232-240.
- Boland B.J., Silbert P.L., Groover R.V., Wollan P.C., Silverstein M.D. (1996) Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Neurol* 14:7-12.
- Bonifati M.D., Ruzza G., Bonometto P., Berardinelli A., Gorni K., Orcesi S., Lanzi G., Angelini C. (2000) A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 23:1344-1347.
- Bonnemann C.G., Modi R., Noguchi S., Mizuno Y., Yoshida M., Gussoni E., McNally E.M., Duggan D.J., Angelini C., Hoffman E.P. (1995) Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet* 11:266-273.
- Bostick B., Ghosh A., Yue Y., Long C., Duan D. (2007) Systemic AAV-9 transduction in mice is influenced by animal age but not by the route of administration. *Gene Ther* 14:1605-1609.
- Bostick B., Yue Y., Lai Y., Long C., Li D., Dongsheng D. (2008) AAV-9 micro-dystrophin gene therapy ameliorates electrocardiographic abnormalities in mdx mice. *Hum Gene Ther*.
- Bradley W.G., Fulthorpe J.J. (1978) Studies of sarcolemmal integrity in myopathic muscle. *Neurology* 28:670-677.
- Bremmer-Bout M., Aartsma-Rus A., de Meijer E.J., Kaman W.E., Janson A.A., Vossen R.H., van Ommen G.J., den Dunnen J.T., van Deutekom J.C. (2004) Targeted exon skipping in transgenic hDMD mice: A model for direct preclinical screening of human-specific antisense oligonucleotides. *Mol Ther* 10:232-240.
- Bridges L.R. (1986) The association of cardiac muscle necrosis and inflammation with the degenerative and persistent myopathy of MDX mice. *J Neurol Sci* 72:147-157.
- Brooke M.H., Fenichel G.M., Griggs R.C., Mendell J.R., Moxley R., Florence J., King W.M., Pandya S., Robison J., Schierbecker J., et al. (1989) Duchenne muscular dystrophy: patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. *Neurology* 39:475-481.
- Brooks A.R., Harkins R.N., Wang P., Qian H.S., Liu P., Rubanyi G.M. (2004) Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 6:395-404.
- Brunetti-Pierri N., Palmer D.J., Beaudet A.L., Carey K.D., Finegold M., Ng P. (2004) Acute toxicity after high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 15:35-46.
- Brussee V., Tardif F., Tremblay J.P. (1997) Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. *Neuromuscul Disord* 7:487-492.
- Bulfield G., Siller W.G., Wight P.A., Moore K.J. (1984) X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1189-1192.
- Buller R.M., Janik J.E., Sebring E.D., Rose J.A. (1981) Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* 40:241-247.
- Büning H., Ried M.U., Perabo L., Gerner F.M., Huttner N.A., Enssle J., Hallek M. (2003) Receptor targeting of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 10:1142-1151.
- Buyse G.M., Van der Mieren G., Erb M., D'Hooge J., Herijgers P., Verbeken E., Jara A., Van Den Bergh A., Mertens L., Courdier-Fruh I., Barzaghi P., Meier T. (2009) Long-term blinded placebo-controlled study of SNT-MC17/idebenone in the dystrophin deficient mdx mouse: cardiac protection and improved exercise performance. *Eur Heart J* 30:116-124.

- Calabrese F., Thiene G. (2003) Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspects. *Cardiovasc Res* 60:11-25.
- Cambria R.A., Anderson R.J., Dikdan G., Teehan E.P., Hernandez-Maldonado J.J., Hobson R.W., 2nd (1991) Leukocyte activation in ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle. *J Surg Res* 51:13-17.
- Campbell K.P., Kahl S.D. (1989) Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 338:259-262.
- Campbell K.P. (1995) Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80:675-679.
- Cassinotti P., Weitz M., Tratschin J.D. (1988) Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein 1. *Virology* 167:176-184.
- Chamberlain J.S., Metzger J., Reyes M., Townsend D., Faulkner J.A. (2007) Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB J* 21:2195-2204.
- Chao H., Liu Y., Rabinowitz J., Li C., Samulski R.J., Walsh C.E. (2000) Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther* 2:619-623.
- Chen S., Kroll M.H., Shohet R.V., Frenkel P., Mayer S.A., Grayburn P.A. (2002) Bioeffects of myocardial contrast microbubble destruction by echocardiography. *Echocardiography* 19:495-500.
- Chen S., Shohet R.V., Bekeredjian R., Frenkel P., Grayburn P.A. (2003) Optimization of ultrasound parameters for cardiac gene delivery of adenoviral or plasmid deoxyribonucleic acid by ultrasound-targeted microbubble destruction. *J Am Coll Cardiol* 42:301-308.
- Chenard A.A., Becane H.M., Tertrain F., de Kermadec J.M., Weiss Y.A. (1993) Ventricular arrhythmia in Duchenne muscular dystrophy: prevalence, significance and prognosis. *Neuromuscul Disord* 3:201-206.
- Cheung A.K., Hoggan M.D., Hauswirth W.W., Berns K.I. (1980) Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J Virol* 33:739-748.
- Christiansen J.P., French B.A., Klibanov A.L., Kaul S., Lindner J.R. (2003) Targeted tissue transfection with ultrasound destruction of plasmid-bearing cationic microbubbles. *Ultrasound Med Biol* 29:1759-1767.
- Chu D., Sullivan C.C., Weitzman M.D., Du L., Wolf P.L., Jamieson S.W., Thistlethwaite P.A. (2003) Direct comparison of efficiency and stability of gene transfer into the mammalian heart using adeno-associated virus versus adenovirus vectors. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126:671-679.
- Clarke M.S., Khakee R., McNeil P.L. (1993) Loss of cytoplasmic basic fibroblast growth factor from physiologically wounded myofibers of normal and dystrophic muscle. *J Cell Sci* 106 (Pt 1):121-133.
- Cohn R.D., Durbeej M., Moore S.A., Coral-Vazquez R., Prouty S., Campbell K.P. (2001) Prevention of cardiomyopathy in mouse models lacking the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J Clin Invest* 107:R1-7.
- Cohn R.D., Liang H.Y., Shetty R., Abraham T., Wagner K.R. (2007) Myostatin does not regulate cardiac hypertrophy or fibrosis. *Neuromuscul Disord* 17:290-296.
- Cooper B.J. (1989) Animal models of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Br Med Bull* 45:703-718.
- Coral-Vazquez R., Cohn R.D., Moore S.A., Hill J.A., Weiss R.M., Davisson R.L., Straub V., Barresi R., Bansal D., Hrstka R.F., Williamson R., Campbell K.P. (1999) Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell* 98:465-474.
- Corrado G., Lissoni A., Beretta S., Terenghi L., Tadeo G., Foglia-Manzillo G., Tagliagambe L.M., Spata M., Santarone M. (2002) Prognostic value of electrocardiograms, ventricular late potentials, ventricular arrhythmias, and left ventricular systolic dysfunction in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Cardiol* 89:838-841.
- Coulton G.R., Morgan J.E., Partridge T.A., Sloper J.C. (1988) The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14:53-70.
- Culligan K., Ohlendieck K. (2002) Diversity of the Brain Dystrophin-Glycoprotein Complex. *J Biomed Biotechnol* 2:31-36.
- Dangain J., Vrbova G. (1984) Muscle development in mdx mutant mice. *Muscle Nerve* 7:700-704.

- Deconinck A.E., Rafael J.A., Skinner J.A., Brown S.C., Potter A.C., Metzinger L., Watt D.J., Dickson J.G., Tinsley J.M., Davies K.E. (1997) Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90:717-727.
- Deconinck N., Ragot T., Marechal G., Perricaudet M., Gillis J.M. (1996) Functional protection of dystrophic mouse (mdx) muscles after adenovirus-mediated transfer of a dystrophin minigene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3570-3574.
- Denti M.A., Rosa A., D'Antona G., Sthandier O., De Angelis F.G., Nicoletti C., Allocca M., Pansarasa O., Parente V., Musaro A., Auricchio A., Bottinelli R., Bozzoni I. (2006) Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3758-3763.
- Di Pasquale G., Chiorini J.A. (2006) AAV transcytosis through barrier epithelia and endothelium. *Mol Ther* 13:506-516.
- Ding W., Zhang L., Yan Z., Engelhardt J.F. (2005) Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 12:873-880.
- Doing A.H., Renlund D.G., Smith R.A. (2002) Becker muscular dystrophy-related cardiomyopathy: a favorable response to medical therapy. *J Heart Lung Transplant* 21:496-498.
- Donahue J.K., Kikkawa K., Thomas A.D., Marban E., Lawrence J.H. (1998) Acceleration of widespread adenoviral gene transfer to intact rabbit hearts by coronary perfusion with low calcium and serotonin. *Gene Ther* 5:630-634.
- Du L., Kido M., Lee D.V., Rabinowitz J.E., Samulski R.J., Jamieson S.W., Weitzman M.D., Thistlethwaite P.A. (2004) Differential myocardial gene delivery by recombinant serotype-specific adeno-associated viral vectors. *Mol Ther* 10:604-608.
- Duan D., Yan Z., Yue Y., Ding W., Engelhardt J.F. (2001) Enhancement of muscle gene delivery with pseudotyped adeno-associated virus type 5 correlates with myoblast differentiation. *J Virol* 75:7662-7671.
- Dubielzig R., King J.A., Weger S., Kern A., Kleinschmidt J.A. (1999) Adeno-associated virus type 2 protein interactions: formation of pre-encapsidation complexes. *J Virol* 73:8989-8998.
- Durbeej M., Campbell K.P. (2002) Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev* 12:349-361.
- Eagle M., Bourke J., Bullock R., Gibson M., Mehta J., Giddings D., Straub V., Bushby K. (2007) Managing Duchenne muscular dystrophy--the additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscul Disord* 17:470-475.
- Emery A.E. (1998) The muscular dystrophies. *BMJ* 317:991-995.
- Emery A.E. (2002) Muscular dystrophy into the new millennium. *Neuromuscul Disord* 12:343-349.
- Engert J.C., Berglund E.B., Rosenthal N. (1996) Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J Cell Biol* 135:431-440.
- England S.B., Nicholson L.V., Johnson M.A., Forrest S.M., Love D.R., Zubrzycka-Gaarn E.E., Bulman D.E., Harris J.B., Davies K.E. (1990) Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 343:180-182.
- Erles K., Sebokova P., Schlehofer J.R. (1999) Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol* 59:406-411.
- Fabb S.A., Wells D.J., Serpente P., Dickson G. (2002) Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice. *Hum Mol Genet* 11:733-741.
- Farah M.G., Evans E.B., Vignos P.J., Jr. (1980) Echocardiographic evaluation of left ventricular function in Duchenne's muscular dystrophy. *Am J Med* 69:248-254.
- Fenoglio J.J., Jr., Pham T.D., Harken A.H., Horowitz L.N., Josephson M.E., Wit A.L. (1983) Recurrent sustained ventricular tachycardia: structure and ultrastructure of subendocardial regions in which tachycardia originates. *Circulation* 68:518-533.
- Fielding R.A., Manfredi T.J., Ding W., Fiatarone M.A., Evans W.J., Cannon J.G. (1993) Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol* 265:R166-172.
- Flanigan K.M., von Niederhausern A., Dunn D.M., Alder J., Mendell J.R., Weiss R.B. (2003) Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 72:931-939.
- Formigli L., Lombardo L.D., Adembri C., Brunelleschi S., Ferrari E., Novelli G.P. (1992) Neutrophils as mediators of human skeletal muscle ischemia-reperfusion syndrome. *Hum Pathol* 23:627-634.
- Frankel K.A., Rosser R.J. (1976) The pathology of the heart in progressive muscular dystrophy: epimycocardial fibrosis. *Hum Pathol* 7:375-386.
- French B.A., Mazur W., Geske R.S., Bolli R. (1994) Direct in vivo gene transfer into porcine myocardium using replication-deficient adenoviral vectors. *Circulation* 90:2414-2424.

- Friedrich O., Both M., Gillis J.M., Chamberlain J.S., Fink R.H. (2004) Mini-dystrophin restores L-type calcium currents in skeletal muscle of transgenic mdx mice. *J Physiol* 555:251-265.
- Gao G., Vandenberghe L.H., Alvira M.R., Lu Y., Calcedo R., Zhou X., Wilson J.M. (2004) Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 78:6381-6388.
- Gao G.P., Alvira M.R., Wang L., Calcedo R., Johnston J., Wilson J.M. (2002) Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11854-11859.
- Gayraud J., Matecki S., Hnia K., Mornet D., Prefaut C., Mercier J., Michel A., Ramonatxo M. (2007) Ventilation during air breathing and in response to hypercapnia in 5 and 16 month-old mdx and C57 mice. *J Muscle Res Cell Motil* 28:29-37.
- Glesby M.J., Rosenmann E., Nylen E.G., Wroegemann K. (1988) Serum CK, calcium, magnesium, and oxidative phosphorylation in mdx mouse muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 11:852-856.
- Grady R.M., Teng H., Nichol M.C., Cunningham J.C., Wilkinson R.S., Sanes J.R. (1997) Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90:729-738.
- Greber U.F., Willetts M., Webster P., Helenius A. (1993) Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75:477-486.
- Gregorevic P., Plant D.R., Leeding K.S., Bach L.A., Lynch G.S. (2002) Improved contractile function of the mdx dystrophic mouse diaphragm muscle after insulin-like growth factor-I administration. *Am J Pathol* 161:2263-2272.
- Gregorevic P., Blankinship M.J., Allen J.M., Crawford R.W., Meuse L., Miller D.G., Russell D.W., Chamberlain J.S. (2004) Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 10:828-834.
- Gregorevic P., Allen J.M., Minami E., Blankinship M.J., Haraguchi M., Meuse L., Finn E., Adams M.E., Froehner S.C., Murry C.E., Chamberlain J.S. (2006) rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat Med* 12:787-789.
- Grimm D., Kay M.A. (2003) From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 3:281-304.
- Grimm D., Kay M.A., Kleinschmidt J.A. (2003a) Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol Ther* 7:839-850.
- Grimm D., Zhou S., Nakai H., Thomas C.E., Storm T.A., Fuess S., Matsushita T., Allen J., Surosky R., Lochrie M., Meuse L., McClelland A., Colosi P., Kay M.A. (2003b) Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy. *Blood* 102:2412-2419.
- Griscelli F., Gilardi-Hebenstreit P., Hanania N., Franz W.M., Opolon P., Perricaudet M., Ragot T. (1998) Heart-specific targeting of beta-galactosidase by the ventricle-specific cardiac myosin light chain 2 promoter using adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 9:1919-1928.
- Grounds M.D., Torrisi J. (2004) Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J* 18:676-682.
- Grunig E., Tasman J.A., Kucherer H., Franz W., Kubler W., Katus H.A. (1998) Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 31:186-194.
- Guzman R.J., Lemarchand P., Crystal R.G., Epstein S.E., Finkel T. (1993) Efficient gene transfer into myocardium by direct injection of adenovirus vectors. *Circ Res* 73:1202-1207.
- Hamer P.W., McGeachie J.M., Davies M.J., Grounds M.D. (2002) Evans Blue Dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *J Anat* 200:69-79.
- Hansen J., Qing K., Srivastava A. (2001) Infection of purified nuclei by adeno-associated virus 2. *Mol Ther* 4:289-296.
- Harper S.Q., Hauser M.A., DelloRusso C., Duan D., Crawford R.W., Phelps S.F., Harper H.A., Robinson A.S., Engelhardt J.F., Brooks S.V., Chamberlain J.S. (2002) Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* 8:253-261.
- Hartigan-O'Connor D., Kirk C.J., Crawford R., Mule J.J., Chamberlain J.S. (2001) Immune evasion by muscle-specific gene expression in dystrophic muscle. *Mol Ther* 4:525-533.
- Hauswirth W.W., Lewin A.S., Zolotukhin S., Muzyczka N. (2000) Production and purification of recombinant adeno-associated virus. *Methods Enzymol* 316:743-761.
- Head S., Williams D., Stephenson G. (1994) Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contraction with stretch. *J Muscle Res Cell Motil* 15:490-492.
- Hedman M., Hartikainen J., Syvanne M., Stjernvall J., Hedman A., Kivela A., Vanninen E., Mussalo H., Kauppila E., Simula S., Narvanen O., Rantala A., Peuhkurinen K., Nieminen M.S., Laakso M.,

- Yla-Herttuala S. (2003) Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 107:2677-2683.
- Henry T.D., Grines C.L., Watkins M.W., Dib N., Barbeau G., Moreadith R., Andrasfay T., Engler R.L. (2007) Effects of Ad5FGF-4 in patients with angina: an analysis of pooled data from the AGENT-3 and AGENT-4 trials. *J Am Coll Cardiol* 50:1038-1046.
- Hermonat P.L., Labow M.A., Wright R., Berns K.I., Muzyczka N. (1984) Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *J Virol* 51:329-339.
- Hirawat S., Welch E.M., Elfring G.L., Northcutt V.J., Paushkin S., Hwang S., Leonard E.M., Almstead N.G., Ju W., Peltz S.W., Miller L.L. (2007) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J Clin Pharmacol* 47:430-444.
- Hoggan M.D., Blacklow N.R., Rowe W.P. (1966) Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55:1467-1474.
- Huber P.E., Pfisterer P. (2000) In vitro and in vivo transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound. *Gene Ther* 7:1516-1525.
- Im W.B., Phelps S.F., Copen E.H., Adams E.G., Slightom J.L., Chamberlain J.S. (1996) Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Hum Mol Genet* 5:1149-1153.
- Inagaki K., Fuess S., Storm T.A., Gibson G.A., McTiernan C.F., Kay M.A., Nakai H. (2006) Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther* 14:45-53.
- Ishikawa K. (1997) Cardiac involvement in progressive muscular dystrophy of the Duchenne type. *Jpn Heart J* 38:163-180.
- Ishikawa Y., Bach J.R., Sarma R.J., Tamura T., Song J., Marra S.W., Minami R. (1995) Cardiovascular considerations in the management of neuromuscular disease. *Semin Neurol* 15:93-108.
- Ishikawa Y., Bach J.R., Minami R. (1999) Cardioprotection for Duchenne's muscular dystrophy. *Am Heart J* 137:895-902.
- James T.N. (1962) Observations on the cardiovascular involvement, including the cardiac conduction system, in progressive muscular dystrophy. *Am Heart J* 63:48-56.
- Johnson F.B., Ozer H.L., Hoggan M.D. (1971) Structural proteins of adenovirus-associated virus type 3. *J Virol* 8:860-863.
- Jolly S.R., Kane W.J., Hook B.G., Abrams G.D., Kunkel S.L., Lucchesi B.R. (1986) Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion. *Am Heart J* 112:682-690.
- Jorgensen L.H., Larochelle N., Orlopp K., Dunant P., Dudley R.W., Stucka R., Thirion C., Walter M.C., Laval S.H., Lochmüller H. (2009) Efficient and fast functional screening of microdystrophin constructs in vivo and in vitro for therapy of duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 20:641-650.
- Kakulas B.A. (1999) Problems and solutions in the rehabilitation of patients with progressive muscular dystrophy. *Scand J Rehabil Med Suppl* 39:23-37.
- Karpati G., Carpenter S., Prescott S. (1988) Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer necrosis in mdx mouse dystrophy. *Muscle Nerve* 11:795-803.
- Kastrup J., Jorgensen E., Ruck A., Tagil K., Glogar D., Ruzyllo W., Botker H.E., Dudek D., Drvota V., Hesse B., Thuesen L., Blomberg P., Gyongyosi M., Sylven C. (2005) Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol* 45:982-988.
- Kawamoto S., Shi Q., Nitta Y., Miyazaki J., Allen M.D. (2005) Widespread and early myocardial gene expression by adeno-associated virus vector type 6 with a beta-actin hybrid promoter. *Mol Ther* 11:980-985.
- Kern A., Schmidt K., Leder C., Müller O.J., Wobus C.E., Bettinger K., Von der Lieth C.W., King J.A., Kleinschmidt J.A. (2003) Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *J Virol* 77:11072-11081.
- Kilham L., Olivier L.J. (1959) A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology* 7:428-437.

- King W.M., Ruttencutter R., Nagaraja H.N., Matkovic V., Landoll J., Hoyle C., Mendell J.R., Kissel J.T. (2007) Orthopedic outcomes of long-term daily corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 68:1607-1613.
- Koenig M., Monaco A.P., Kunkel L.M. (1988) The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53:219-228.
- Kondo I., Ohmori K., Oshita A., Takeuchi H., Fuke S., Shinomiya K., Noma T., Namba T., Kohno M. (2004) Treatment of acute myocardial infarction by hepatocyte growth factor gene transfer: the first demonstration of myocardial transfer of a "functional" gene using ultrasonic microbubble destruction. *J Am Coll Cardiol* 44:644-653.
- Korpany G., Chen S., Shohet R.V., Ding J., Yang B., Frenkel P.A., Grayburn P.A. (2005) Targeting of VEGF-mediated angiogenesis to rat myocardium using ultrasonic destruction of microbubbles. *Gene Ther* 12:1305-1312.
- Korthuis R.J., Grisham M.B., Granger D.N. (1988) Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 254:H823-827.
- Lai N.C., Roth D.M., Gao M.H., Fine S., Head B.P., Zhu J., McKirnan M.D., Kwong C., Dalton N., Urasawa K., Roth D.A., Hammond H.K. (2000) Intracoronary delivery of adenovirus encoding adenylyl cyclase VI increases left ventricular function and cAMP-generating capacity. *Circulation* 102:2396-2401.
- Lanza G.A., Dello Russo A., Giglio V., De Luca L., Messano L., Santini C., Ricci E., Damiani A., Fumagalli G., De Martino G., Mangiola F., Bellocchi F. (2001) Impairment of cardiac autonomic function in patients with Duchenne muscular dystrophy: relationship to myocardial and respiratory function. *Am Heart J* 141:808-812.
- Laughlin C.A., Westphal H., Carter B.J. (1979) Spliced adenovirus-associated virus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5567-5571.
- Laughlin C.A., Cardellicchio C.B., Coon H.C. (1986) Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2. *J Virol* 60:515-524.
- Leong-Poi H., Le E., Rim S.J., Sakuma T., Kaul S., Wei K. (2001) Quantification of myocardial perfusion and determination of coronary stenosis severity during hyperemia using real-time myocardial contrast echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 14:1173-1182.
- Li C., Hirsch M., Asokan A., Zeithaml B., Ma H., Kafri T., Samulski R.J. (2007) Adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid-specific cytotoxic T lymphocytes eliminate only vector-transduced cells coexpressing the AAV2 capsid in vivo. *J Virol* 81:7540-7547.
- Li P., Cao L.Q., Dou C.Y., Armstrong W.F., Miller D. (2003) Impact of myocardial contrast echocardiography on vascular permeability: an in vivo dose response study of delivery mode, pressure amplitude and contrast dose. *Ultrasound Med Biol* 29:1341-1349.
- Li P., Armstrong W.F., Miller D.L. (2004) Impact of myocardial contrast echocardiography on vascular permeability: comparison of three different contrast agents. *Ultrasound Med Biol* 30:83-91.
- Lim L.E., Duclos F., Broux O., Bourg N., Sunada Y., Allamand V., Meyer J., Richard I., Moomaw C., Slaughter C., et al. (1995) Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet* 11:257-265.
- Liu M., Yue Y., Harper S.Q., Grange R.W., Chamberlain J.S., Duan D. (2005) Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* 11:245-256.
- Logeart D., Hatem S.N., Heimbürger M., Le Roux A., Michel J.B., Mercadier J.J. (2001) How to optimize in vivo gene transfer to cardiac myocytes: mechanical or pharmacological procedures? *Hum Gene Ther* 12:1601-1610.
- Losordo D.W., Vale P.R., Symes J.F., Dunnington C.H., Esakof D.D., Maysky M., Ashare A.B., Lathi K., Isner J.M. (1998) Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 98:2800-2804.
- Losordo D.W., Vale P.R., Hendel R.C., Milliken C.E., Fortuin F.D., Cummings N., Schatz R.A., Asahara T., Isner J.M., Kuntz R.E. (2002) Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 105:2012-2018.
- Lu Q.L., Rabinowitz A., Chen Y.C., Yokota T., Yin H., Alter J., Jadoon A., Bou-Gharios G., Partridge T. (2005) Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:198-203.
- Lusby E., Fife K.H., Berns K.I. (1980) Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J Virol* 34:402-409.
- Lyon A.R., Sato M., Hajjar R.J., Samulski R.J., Harding S.E. (2008) Gene therapy: targeting the myocardium. *Heart* 94:89-99.

- Malm C., Nyberg P., Engstrom M., Sjodin B., Lenkei R., Ekblom B., Lundberg I. (2000) Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopsies. *J Physiol* 529 Pt 1:243-262.
- Manno C.S., Chew A.J., Hutchison S., Larson P.J., Herzog R.W., Arruda V.R., Tai S.J., Ragni M.V., Thompson A., Ozelo M., Couto L.B., Leonard D.G., Johnson F.A., McClelland A., Scallan C., Skarsgard E., Flake A.W., Kay M.A., High K.A., Glader B. (2003) AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101:2963-2972.
- Manzur A.Y., Kuntzer T., Pike M., Swan A. (2004) Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003725.
- Maron B.J., Towbin J.A., Thiene G., Antzelevitch C., Corrado D., Arnett D., Moss A.J., Seidman C.E., Young J.B. (2006) Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113:1807-1816.
- Marshall P.A., Williams P.E., Goldspink G. (1989) Accumulation of collagen and altered fiber-type ratios as indicators of abnormal muscle gene expression in the mdx dystrophic mouse. *Muscle Nerve* 12:528-537.
- Mayer C.R., Bekeredjian R. (2008) Ultrasonic gene and drug delivery to the cardiovascular system. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1177-1192.
- Mays L.E., Vandenberghe L.H., Xiao R., Bell P., Nam H.J., Agbandje-McKenna M., Wilson J.M. (2009) Adeno-associated virus capsid structure drives CD4-dependent CD8+ T cell response to vector encoded proteins. *J Immunol* 182:6051-6060.
- McCarty D.M., Monahan P.E., Samulski R.J. (2001) Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 8:1248-1254.
- McCarty D.M., Fu H., Monahan P.E., Toulson C.E., Naik P., Samulski R.J. (2003) Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* 10:2112-2118.
- McCarty D.M., Young S.M., Jr., Samulski R.J. (2004) Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet* 38:819-845.
- McDonald C.M., Abresch R.T., Carter G.T., Fowler W.M., Jr., Johnson E.R., Kilmer D.D., Sigford B.J. (1995) Profiles of neuromuscular diseases. Duchenne muscular dystrophy. *Am J Phys Med Rehabil* 74:S70-92.
- McDouall R.M., Dunn M.J., Dubowitz V. (1990) Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 99:199-217.
- McGeachie J.K., Grounds M.D., Partridge T.A., Morgan J.E. (1993) Age-related changes in replication of myogenic cells in mdx mice: quantitative autoradiographic studies. *J Neurol Sci* 119:169-179.
- McLaughlin S.K., Collis P., Hermonat P.L., Muzyczka N. (1988) Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol* 62:1963-1973.
- Melacini P., Vianello A., Villanova C., Fanin M., Miorin M., Angelini C., Dalla Volta S. (1996) Cardiac and respiratory involvement in advanced stage Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 6:367-376.
- Melnick J.L., Mayor H.D., Smith K.O., Rapp F. (1965) Association of 20-Millimicron Particles with Adenoviruses. *J Bacteriol* 90:271-274.
- Mendelson E., Trempe J.P., Carter B.J. (1986) Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide. *J Virol* 60:823-832.
- Messina S., Bitto A., Aguenouz M., Minutoli L., Monici M.C., Altavilla D., Squadrito F., Vita G. (2006) Nuclear factor kappa-B blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in Mdx mice. *Exp Neurol* 198:234-241.
- Metules T. (2002) Duchenne muscular dystrophy. *RN* 65:39-44, 47; quiz 48.
- Miller D.L., Driscoll E.M., Dou C., Armstrong W.F., Lucchesi B.R. (2006) Microvascular permeabilization and cardiomyocyte injury provoked by myocardial contrast echocardiography in a canine model. *J Am Coll Cardiol* 47:1464-1468.
- Mital A., Kumari D., Gupta M., Goyle S. (1998) Molecular characterisation of Duchenne muscular dystrophy and phenotypic correlation. *J Neurol Sci* 157:179-186.
- Miyagawa S., Sawa Y., Taketani S., Kawaguchi N., Nakamura T., Matsuura N., Matsuda H. (2002) Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. *Circulation* 105:2556-2561.

- Mizuno Y. (1992) Prevention of myonecrosis in mdx mice: effect of immobilization by the local tetanus method. *Brain Dev* 14:319-322.
- Moens P., Baatsen P.H., Marechal G. (1993) Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch. *J Muscle Res Cell Motil* 14:446-451.
- Moise N.S., Valentine B.A., Brown C.A., Erb H.N., Beck K.A., Cooper B.J., Gilmour R.F. (1991) Duchenne's cardiomyopathy in a canine model: electrocardiographic and echocardiographic studies. *J Am Coll Cardiol* 17:812-820.
- Mokhtarian A., Lefaucheur J.P., Even P.C., Sebillé A. (1999) Hindlimb immobilization applied to 21-day-old mdx mice prevents the occurrence of muscle degeneration. *J Appl Physiol* 86:924-931.
- Monahan P.E., Samulski R.J. (2000) Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Mol Med Today* 6:433-440.
- Mori S., Wang L., Takeuchi T., Kanda T. (2004) Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 330:375-383.
- Moriuchi T., Fujii Y., Kagawa N., Hizawa K. (1991) Autopsy study on the weight of the heart, liver, kidney and brain in Duchenne muscular dystrophy. *Tokushima J Exp Med* 38:5-13.
- Moss R.B., Rodman D., Spencer L.T., Aitken M.L., Zeitlin P.L., Waltz D., Milla C., Brody A.S., Clancy J.P., Ramsey B., Hamblett N., Heald A.E. (2004) Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* 125:509-521.
- Müller O.J., Kaul F., Weitzman M.D., Pasqualini R., Arap W., Kleinschmidt J.A., Trepel M. (2003) Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol* 21:1040-1046.
- Müller O.J., Leuchs B., Pleger S.T., Grimm D., Franz W.M., Katus H.A., Kleinschmidt J.A. (2006) Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc Res* 70:70-78.
- Müller O.J., Ksienzyk J., Katus H.A. (2008a) Gene-therapy delivery strategies in cardiology. *Future Cardiol* 4:135-150.
- Müller O.J., Schinkel S., Kleinschmidt J.A., Katus H.A., Bekeredjian R. (2008b) Augmentation of AAV-mediated cardiac gene transfer after systemic administration in adult rats. *Gene Ther* 15:1558-1565.
- Muntoni F., Torelli S., Ferlini A. (2003) Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2:731-740.
- Muruve D.A., Barnes M.J., Stillman I.E., Libermann T.A. (1999) Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. *Hum Gene Ther* 10:965-976.
- Muruve D.A., Cotter M.J., Zaiss A.K., White L.R., Liu Q., Chan T., Clark S.A., Ross P.J., Meulenbroek R.A., Maelandsmo G.M., Parks R.J. (2004) Helper-dependent adenovirus vectors elicit intact innate but attenuated adaptive host immune responses in vivo. *J Virol* 78:5966-5972.
- Muzyczka N., Samulski R.J., Hermonat P., Srivastava A., Berns K.I. (1984) The genetics of adeno-associated virus. *Adv Exp Med Biol* 179:151-161.
- Nagai T. (1989) Prognostic evaluation of congestive heart failure in patients with Duchenne muscular dystrophy--retrospective study using non-invasive cardiac function tests. *Jpn Circ J* 53:406-415.
- Nakai H., Fuess S., Storm T.A., Muramatsu S., Nara Y., Kay M.A. (2005) Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol* 79:214-224.
- Nigro G., Comi L.I., Politano L., Bain R.J. (1990) The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol* 26:271-277.
- Nishino I., Ozawa E. (2002) Muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 15:539-544.
- Nobile C., Marchi J., Nigro V., Roberts R.G., Danieli G.A. (1997) Exon-intron organization of the human dystrophin gene. *Genomics* 45:421-424.
- Noguchi S., McNally E.M., Ben Othmane K., Hagiwara Y., Mizuno Y., Yoshida M., Yamamoto H., Bonnemant C.G., Gussoni E., Denton P.H., Kyriakides T., Middleton L., Hentati F., Ben Hamida M., Nonaka I., Vance J.M., Kunkel L.M., Ozawa E. (1995) Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* 270:819-822.
- Nowak K.J., Davies K.E. (2004) Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep* 5:872-876.
- O'Brien T.X., Lee K.J., Chien K.R. (1993) Positional specification of ventricular myosin light chain 2 expression in the primitive murine heart tube. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5157-5161.

- Odom G.L., Gregorevic P., Chamberlain J.S. (2007) Viral-mediated gene therapy for the muscular dystrophies: successes, limitations and recent advances. *Biochim Biophys Acta* 1772:243-262.
- Pacak C.A., Mah C.S., Thattaliyath B.D., Conlon T.J., Lewis M.A., Cloutier D.E., Zolotukhin I., Tarantal A.F., Byrne B.J. (2006) Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res* 99:e3-9.
- Pacak C.A., Sakai Y., Thattaliyath B.D., Mah C.S., Byrne B.J. (2008) Tissue specific promoters improve specificity of AAV9 mediated transgene expression following intra-vascular gene delivery in neonatal mice. *Genet Vaccines Ther* 6:13.
- Palmert M.R., Alexander S.W., Goorin A.M. (2004) Ovarian toxicity after chemotherapy: possible association with ifosfamide administration. *Pediatr Blood Cancer* 42:216-219.
- Palomeque J., Chemaly E.R., Colosi P., Wellman J.A., Zhou S., Del Monte F., Hajjar R.J. (2007) Efficiency of eight different AAV serotypes in transducing rat myocardium in vivo. *Gene Ther* 14:989-997.
- Pardo J.V., Siliciano J.D., Craig S.W. (1983) A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1008-1012.
- Perabo L., Büning H., Kofler D.M., Ried M.U., Girod A., Wendtner C.M., Enssle J., Hallek M. (2003) In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display. *Mol Ther* 8:151-157.
- Petrof B.J., Shrager J.B., Stedman H.H., Kelly A.M., Sweeney H.L. (1993) Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3710-3714.
- Phillips M.I., Tang Y., Schmidt-Ott K., Qian K., Kagiya S. (2002) Vigilant vector: heart-specific promoter in an adeno-associated virus vector for cardioprotection. *Hypertension* 39:651-655.
- Postema M., van Wamel A., Lancee C.T., de Jong N. (2004) Ultrasound-induced encapsulated microbubble phenomena. *Ultrasound Med Biol* 30:827-840.
- Qasba P., Danishefsky K., Gadot M., Siddiqui M.A. (1992) Functional analysis of a CARG-like promoter element in cardiac myosin light chain 2 gene. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 38:561-569.
- Qin L., Ding Y., Pahud D.R., Chang E., Imperiale M.J., Bromberg J.S. (1997) Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression. *Hum Gene Ther* 8:2019-2029.
- Quinlan J.G., Hahn H.S., Wong B.L., Lorenz J.N., Wenisch A.S., Levin L.S. (2004) Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul Disord* 14:491-496.
- Quinlivan R.M., Lewis P., Marsden P., Dundas R., Robb S.A., Baker E., Maisey M. (1996) Cardiac function, metabolism and perfusion in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 6:237-246.
- Raake P., von Degenfeld G., Hinkel R., Vachenaue R., Sandner T., Beller S., Andrees M., Kupatt C., Schuler G., Boekstegers P. (2004) Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery. *J Am Coll Cardiol* 44:1124-1129.
- Raake P.W., Hinkel R., Müller S., Delker S., Kreuzpointner R., Kupatt C., Katus H.A., Kleinschmidt J.A., Boekstegers P., Müller O.J. (2008) Cardio-specific long-term gene expression in a porcine model after selective pressure-regulated retroinfusion of adeno-associated viral (AAV) vectors. *Gene Ther* 15:12-17.
- Rabinowitz J.E., Rolling F., Li C., Conrath H., Xiao W., Xiao X., Samulski R.J. (2002) Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 76:791-801.
- Ragot T., Vincent N., Chafey P., Vigne E., Gilgenkrantz H., Couton D., Cartaud J., Briand P., Kaplan J.C., Perricaudet M., et al. (1993) Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature* 361:647-650.
- Raymackers J.M., Debaix H., Colson-Van Schoor M., De Backer F., Tajeddine N., Schwaller B., Gailly P., Gillis J.M. (2003) Consequence of parvalbumin deficiency in the mdx mouse: histological, biochemical and mechanical phenotype of a new double mutant. *Neuromuscul Disord* 13:376-387.
- Reilly J.P., Grise M.A., Fortuin F.D., Vale P.R., Schaer G.L., Lopez J., JR V.A.N.C., Henry T., Richenbacher W.E., Losordo D.W., Schatz R.A., Isner J.M. (2005) Long-term (2-year) clinical events following transthoracic intramyocardial gene transfer of VEGF-2 in no-option patients. *J Interv Cardiol* 18:27-31.

- Roberds S.L., Leturcq F., Allamand V., Piccolo F., Jeanpierre M., Anderson R.D., Lim L.E., Lee J.C., Tome F.M., Romero N.B., et al. (1994) Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 78:625-633.
- Rodino-Klapac L.R., Janssen P.M., Montgomery C.L., Coley B.D., Chicoine L.G., Clark K.R., Mendell J.R. (2007) A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Transl Med* 5:45.
- Roelvink P.W., Mi Lee G., Einfeld D.A., Kovesdi I., Wickham T.J. (1999) Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science* 286:1568-1571.
- Roig M., Roma J., Fargas A., Munell F. (2004) Longitudinal pathologic study of the gastrocnemius muscle group in mdx mice. *Acta Neuropathol* 107:27-34.
- Roland E.H. (2000) Muscular dystrophy. *Pediatr Rev* 21:233-237; quiz 238.
- Rose J.A., Maizel J.V., Jr., Inman J.K., Shatkin A.J. (1971) Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J Virol* 8:766-770.
- Rosenthal S.M., Cheng Z.Q. (1995) Opposing early and late effects of insulin-like growth factor I on differentiation and the cell cycle regulatory retinoblastoma protein in skeletal myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10307-10311.
- Rubin I.L. (1952) The heart in progressive muscular dystrophy. *Am Heart J* 43:161-169.
- Ruffing M., Zentgraf H., Kleinschmidt J.A. (1992) Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J Virol* 66:6922-6930.
- Ruffing M., Heid H., Kleinschmidt J.A. (1994) Mutations in the carboxy terminus of adeno-associated virus 2 capsid proteins affect viral infectivity: lack of an RGD integrin-binding motif. *J Gen Virol* 75 (Pt 12):3385-3392.
- Rutanen J., Rissanen T.T., Markkanen J.E., Gruchala M., Silvennoinen P., Kivela A., Hedman A., Hedman M., Heikura T., Orden M.R., Stacker S.A., Achen M.G., Hartikainen J., Yla-Herttuala S. (2004) Adenoviral catheter-mediated intramyocardial gene transfer using the mature form of vascular endothelial growth factor-D induces transmural angiogenesis in porcine heart. *Circulation* 109:1029-1035.
- Rybakova I.N., Patel J.R., Ervasti J.M. (2000) The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol* 150:1209-1214.
- Samulski R.J., Chang L.S., Shenk T. (1989) Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63:3822-3828.
- Sanlioglu S., Benson P.K., Yang J., Atkinson E.M., Reynolds T., Engelhardt J.F. (2000) Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol* 74:9184-9196.
- Sasaki K., Sakata K., Kachi E., Hirata S., Ishihara T., Ishikawa K. (1998) Sequential changes in cardiac structure and function in patients with Duchenne type muscular dystrophy: a two-dimensional echocardiographic study. *Am Heart J* 135:937-944.
- Schmalbruch H. (1984) Regenerated muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy: a serial section study. *Neurology* 34:60-65.
- Schnepp B.C., Jensen R.L., Chen C.L., Johnson P.R., Clark K.R. (2005) Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol* 79:14793-14803.
- Scott J.M., Li S., Harper S.Q., Welikson R., Bourque D., DelloRusso C., Hauschka S.D., Chamberlain J.S. (2002) Viral vectors for gene transfer of micro-, mini-, or full-length dystrophin. *Neuromuscul Disord* 12 Suppl 1:S23-29.
- Seemann S., Hauff P., Schultze-Mosgau M., Lehmann C., Reszka R. (2002) Pharmaceutical evaluation of gas-filled microparticles as gene delivery system. *Pharm Res* 19:250-257.
- Seidman J.G., Seidman C. (2001) The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 104:557-567.
- Seisenberger G., Ried M.U., Endress T., Büning H., Hallek M., Brauchle C. (2001) Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* 294:1929-1932.
- Shohet R.V., Chen S., Zhou Y.T., Wang Z., Meidell R.S., Unger R.H., Grayburn P.A. (2000) Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. *Circulation* 101:2554-2556.
- Sicinski P., Geng Y., Ryder-Cook A.S., Barnard E.A., Darlison M.G., Barnard P.J. (1989) The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 244:1578-1580.
- Siegl G., Bates R.C., Berns K.I., Carter B.J., Kelly D.C., Kurstak E., Tattersall P. (1985) Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 23:61-73.

- Silversides C.K., Webb G.D., Harris V.A., Biggar D.W. (2003) Effects of deflazacort on left ventricular function in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Cardiol* 91:769-772.
- Smith J.K., Grisham M.B., Granger D.N., Korthuis R.J. (1989) Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 256:H789-793.
- Spurney C.F., Knoblach S., Pistilli E.E., Nagaraju K., Martin G.R., Hoffman E.P. (2008) Dystrophin-deficient cardiomyopathy in mouse: expression of Nox4 and Lox are associated with fibrosis and altered functional parameters in the heart. *Neuromuscul Disord* 18:371-381.
- Srivastava A., Lusby E.W., Berns K.I. (1983) Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* 45:555-564.
- St Pierre B.A., Tidball J.G. (1994) Macrophage activation and muscle remodeling at myotendinous junctions after modifications in muscle loading. *Am J Pathol* 145:1463-1471.
- Stilwell J.L., McCarty D.M., Negishi A., Superfine R., Samulski R.J. (2003) Development and characterization of novel empty adenovirus capsids and their impact on cellular gene expression. *J Virol* 77:12881-12885.
- Straub V., Rafael J.A., Chamberlain J.S., Campbell K.P. (1997) Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 139:375-385.
- Straub V., Donahue K.M., Allamand V., Davisson R.L., Kim Y.R., Campbell K.P. (2000) Contrast agent-enhanced magnetic resonance imaging of skeletal muscle damage in animal models of muscular dystrophy. *Magn Reson Med* 44:655-659.
- Stupka N., Tarnopolsky M.A., Yardley N.J., Phillips S.M. (2001) Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. *J Appl Physiol* 91:1669-1678.
- Summerford C., Samulski R.J. (1998) Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72:1438-1445.
- Summerford C., Bartlett J.S., Samulski R.J. (1999) AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5:78-82.
- Sun B., Zhang H., Franco L.M., Brown T., Bird A., Schneider A., Koeberl D.D. (2005) Correction of glycogen storage disease type II by an adeno-associated virus vector containing a muscle-specific promoter. *Mol Ther* 11:889-898.
- Suzuki K., Totsuka M., Nakaji S., Yamada M., Kudoh S., Liu Q., Sugawara K., Yamaya K., Sato K. (1999) Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *J Appl Physiol* 87:1360-1367.
- Takenaka A., Yokota M., Iwase M., Miyaguchi K., Hayashi H., Saito H. (1993) Discrepancy between systolic and diastolic dysfunction of the left ventricle in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Eur Heart J* 14:669-676.
- Tanabe Y., Esaki K., Nomura T. (1986) Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol* 69:91-95.
- Tidball J.G., Berchenko E., Frenette J. (1999) Macrophage invasion does not contribute to muscle membrane injury during inflammation. *J Leukoc Biol* 65:492-498.
- Tinsley J., Deconinck N., Fisher R., Kahn D., Phelps S., Gillis J.M., Davies K. (1998) Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* 4:1441-1444.
- Torres L.F., Duchon L.W. (1987) The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain* 110 (Pt 2):269-299.
- Townsend D., Blankinship M.J., Allen J.M., Gregorevic P., Chamberlain J.S., Metzger J.M. (2007) Systemic administration of micro-dystrophin restores cardiac geometry and prevents dobutamine-induced cardiac pump failure. *Mol Ther* 15:1086-1092.
- Tratschin J.D., Miller I.L., Carter B.J. (1984) Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J Virol* 51:611-619.
- Trempe J.P., Mendelson E., Carter B.J. (1987) Characterization of adeno-associated virus rep proteins in human cells by antibodies raised against rep expressed in Escherichia coli. *Virology* 161:18-28.
- Turk R., Sterrenburg E., van der Wees C.G., de Meijer E.J., de Menezes R.X., Groh S., Campbell K.P., Noguchi S., van Ommen G.J., den Dunnen J.T., t Hoen P.A. (2006) Common pathological mechanisms in mouse models for muscular dystrophies. *FASEB J* 20:127-129.
- Valentine B.A., Cooper B.J., de Lahunta A., O'Quinn R., Blue J.T. (1988) Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. *J Neurol Sci* 88:69-81.
- van Deutekom J.C., Janson A.A., Ginjaar I.B., Frankhuizen W.S., Aartsma-Rus A., Bremmer-Bout M., den Dunnen J.T., Koop K., van der Kooi A.J., Goemans N.M., de Kimpe S.J., Ekhardt P.F., Venneker E.H., Platenburg G.J., Verschuuren J.J., van Ommen G.J. (2007) Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 357:2677-2686.

- Van Erp C., Irwin N.G., Hoey A.J. (2006) Long-term administration of pirfenidone improves cardiac function in mdx mice. *Muscle Nerve* 34:327-334.
- Vandendriessche T., Thorrez L., Acosta-Sanchez A., Petrus I., Wang L., Ma L., L D.E.W., Iwasaki Y., Gillijns V., Wilson J.M., Collen D., Chuah M.K. (2007) Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy. *J Thromb Haemost* 5:16-24.
- Vassalli G., Bueler H., Dudler J., von Segesser L.K., Kappenberger L. (2003) Adeno-associated virus (AAV) vectors achieve prolonged transgene expression in mouse myocardium and arteries in vivo: a comparative study with adenovirus vectors. *Int J Cardiol* 90:229-238.
- Veldwijk M.R., Topaly J., Laufs S., Hengge U.R., Wenz F., Zeller W.J., Fruehauf S. (2002) Development and optimization of a real-time quantitative PCR-based method for the titration of AAV-2 vector stocks. *Mol Ther* 6:272-278.
- Volpers C., Kochanek S. (2004) Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* 6 Suppl 1:S164-171.
- Von Bibra H., Voigt J.U., Froman M., Bone D., Wranne B., Juhlin-Dannfeldt A. (1999) Interaction of Microbubbles with Ultrasound. *Echocardiography* 16:733-741.
- Wagner J.A., Nepomuceno I.B., Messner A.H., Moran M.L., Batson E.P., Dimiceli S., Brown B.W., Desch J.K., Norbash A.M., Conrad C.K., Guggino W.B., Flotte T.R., Wine J.J., Carter B.J., Reynolds T.C., Moss R.B., Gardner P. (2002) A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Hum Gene Ther* 13:1349-1359.
- Wagner K.R., Hamed S., Hadley D.W., Gropman A.L., Burstein A.H., Escolar D.M., Hoffman E.P., Fischbeck K.H. (2001) Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* 49:706-711.
- Wagner K.R. (2002) Genetic diseases of muscle. *Neurol Clin* 20:645-678.
- Wang X.S., Ponnazhagan S., Srivastava A. (1995) Rescue and replication signals of the adeno-associated virus 2 genome. *J Mol Biol* 250:573-580.
- Wang X.S., Ponnazhagan S., Srivastava A. (1996) Rescue and replication of adeno-associated virus type 2 as well as vector DNA sequences from recombinant plasmids containing deletions in the viral inverted terminal repeats: selective encapsidation of viral genomes in progeny virions. *J Virol* 70:1668-1677.
- Wang X.S., Qing K., Ponnazhagan S., Srivastava A. (1997) Adeno-associated virus type 2 DNA replication in vivo: mutation analyses of the D sequence in viral inverted terminal repeats. *J Virol* 71:3077-3082.
- Wang Z., Ma H.I., Li J., Sun L., Zhang J., Xiao X. (2003) Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* 10:2105-2111.
- Wang Z., Zhu T., Qiao C., Zhou L., Wang B., Zhang J., Chen C., Li J., Xiao X. (2005) Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol* 23:321-328.
- Wang Z., Kuhr C.S., Allen J.M., Blankinship M., Gregorevic P., Chamberlain J.S., Tapscott S.J., Storb R. (2007) Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol Ther* 15:1160-1166.
- Waterkamp D.A., Müller O.J., Ying Y., Trepel M., Kleinschmidt J.A. (2006) Isolation of targeted AAV2 vectors from novel virus display libraries. *J Gene Med* 8:1307-1319.
- Wehling-Henricks M., Jordan M.C., Roos K.P., Deng B., Tidball J.G. (2005) Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hearts is prevented by expression of a neuronal nitric oxide synthase transgene in the myocardium. *Hum Mol Genet* 14:1921-1933.
- Wehling M., Spencer M.J., Tidball J.G. (2001) A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J Cell Biol* 155:123-131.
- Welch E.M. et al. (2007) PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447:87-91.
- Wells D.J., Ferrer A., Wells K.E. (2002) Immunological hurdles in the path to gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Rev Mol Med* 4:1-23.
- Wilding J.R., Schneider J.E., Sang A.E., Davies K.E., Neubauer S., Clarke K. (2005) Dystrophin- and MLP-deficient mouse hearts: marked differences in morphology and function, but similar accumulation of cytoskeletal proteins. *FASEB J* 19:79-81.
- Williams M.W., Bloch R.J. (1999) Differential distribution of dystrophin and beta-spectrin at the sarcolemma of fast twitch skeletal muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil* 20:383-393.
- Willmann R., Possekel S., Dubach-Powell J., Meier T., Ruegg M.A. (2009) Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 19:241-249.

- Woo M., Tanabe Y., Ishii H., Nonaka I., Yokoyama M., Esaki K. (1987) Muscle fiber growth and necrosis in dystrophic muscles: a comparative study between dy and mdx mice. *J Neurol Sci* 82:111-122.
- Wright M.J., Wightman L.M., Lilley C., de Alwis M., Hart S.L., Miller A., Coffin R.S., Thrasher A., Latchman D.S., Marber M.S. (2001) In vivo myocardial gene transfer: optimization, evaluation and direct comparison of gene transfer vectors. *Basic Res Cardiol* 96:227-236.
- Wu Z., Asokan A., Samulski R.J. (2006) Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14:316-327.
- Xiao W., Warrington K.H., Jr., Hearing P., Hughes J., Muzyczka N. (2002) Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2. *J Virol* 76:11505-11517.
- Yang L., Jiang J., Drouin L.M., Agbandje-McKenna M., Chen C., Qiao C., Pu D., Hu X., Wang D.Z., Li J., Xiao X. (2009) A myocardium tropic adeno-associated virus (AAV) evolved by DNA shuffling and in vivo selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3946-3951.
- Yoshimura M., Sakamoto M., Ikemoto M., Mochizuki Y., Yuasa K., Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S. (2004) AAV vector-mediated microdystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype. *Mol Ther* 10:821-828.
- Yuasa K., Sakamoto M., Miyagoe-Suzuki Y., Tanouchi A., Yamamoto H., Li J., Chamberlain J.S., Xiao X., Takeda S. (2002) Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product. *Gene Ther* 9:1576-1588.
- Yuasa K., Yoshimura M., Urasawa N., Ohshima S., Howell J.M., Nakamura A., Hijikata T., Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S. (2007) Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene Ther* 14:1249-1260.
- Yue Y., Li Z., Harper S.Q., Davisson R.L., Chamberlain J.S., Duan D. (2003) Microdystrophin gene therapy of cardiomyopathy restores dystrophin-glycoprotein complex and improves sarcolemma integrity in the mdx mouse heart. *Circulation* 108:1626-1632.
- Zhu T., Zhou L., Mori S., Wang Z., McTiernan C.F., Qiao C., Chen C., Wang D.W., Li J., Xiao X. (2005) Sustained whole-body functional rescue in congestive heart failure and muscular dystrophy hamsters by systemic gene transfer. *Circulation* 112:2650-2659.
- Zincarelli C., Soltys S., Rengo G., Rabinowitz J.E. (2008) Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 16:1073-1080.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Übersicht über den Aufbau und Funktion des Dystrophins, nach (Wells <i>et al.</i> , 2002).	2
Abbildung 1.2: Aufteilung der primären Kardiomyopathien nach (Maron <i>et al.</i> , 2006) und (Seidman and Seidman, 2001).	8
Abbildung 3.1: Sequenzanalyse zur Genotypisierung des verfügbaren Mdx - Stammes.	57
Abbildung 3.2: Histopathologische Untersuchung des Herzmuskels.	60
Abbildung 3.3: Histopathologische Untersuchung des <i>Musculus quadriceps femoris</i> .	61
Abbildung 3.4: Untersuchung des Herzmuskels auf Inflammation.	63
Abbildung 3.5: Untersuchung <i>Musculus quadriceps femoris</i> auf Inflammation.	64
Abbildung 3.6: Quantifizierung von Blutparametern.	66
Abbildung 3.7: Transduktionseffizienz von AAV9-CMV-Luc und AAV9-MLC1.5kb-Luc.	68
Abbildung 3.8: Reporter-genexpressionsprofile der Serotypen AAV2(R484E;R585E) (n= 12) und AAV9 (n= 9), in Kombination mit dem kardial spezifischen CMV verstärkten-MLC1.5kb Promotor in adulten NMRI Mäusen.	69
Abbildung 3.9: Abhängigkeit der Reporter-genaktivität von MLC-Promotoren mit unterschiedlich langen regulatorischen Sequenzen.	70
Abbildung 3.10: Untersuchung der Lokalisation einer kardialen Fluoreszenz - Reporter-genexpression.	72
Abbildung 3.11: Expression von EGFP (grün), kombiniert mit DAPI - Kernfärbung (blau) in transversalen Leberschnitten von adulten NMRI Mäusen.	73
Abbildung 3.12: Kolokalisation von AAV2 mit Mikrosphären.	74
Abbildung 3.13: Gentransfereffizienz nach Ultraschall gestütztem viralen Gentransfer.	76
Abbildung 3.14: Lokalisation der Reporter-genexpression nach Ultraschall gestütztem Gentransfer in Rattenherzen ohne (linke Seite) und mit 1×10^{11} Partikeln von AAV9 – EGFP bealadenen Mikrosphären (rechte Seite).	77
Abbildung 3.15: Histopathologische Untersuchung des Myokards.	78
Abbildung 3.16: Expression des μ Dystrophins <i>in vitro</i> .	79
Abb. 3.17: Expression des μ Dystrophins <i>in vivo</i> .	80
Abbildung 3.18: Immunfluoreszenzanalyse zur Untersuchung unspezifischer Milz - und Leberexpression von μ Dys.	81
Abbildung 3.19: Expressionsstärke des μ Dystrophins <i>in vivo</i> .	82
Abbildung 3.20: Histopathologische Untersuchungen nach Gentransfer.	84
Abbildung 3.21: Immunologische Untersuchung nach Gentransfer.	85
Abbildung 3.22: Immunfluoreszenzanalyse zur Untersuchung der μ Dys – Expression bei Mdx - Tieren unterschiedlichen Alters.	86
Abbildung 4.1: Histopathologische Gegenüberstellung.	102

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht über genetische Mausmodelle mit Defekten in Bestandteilen des DAG-Komplexes und deren Ausprägung einer Kardiomyopathie, zusammengefasst nach (Durbeej and Campbell, 2002).....	12
Tabelle 1.2: Übersicht über die Applikationsverfahren zum kardialen Gentransfer in Tiermodellen, modifiziert nach (Muller <i>et al.</i> , 2008a).....	18
Tabelle 1.3: Übersicht über die Promotoren zum kardialen Gentransfer in Tiermodellen, modifiziert nach (Muller <i>et al.</i> , 2008a).....	23
Tabelle 3.1: Einfluss der Beladung von Mikrosphären mit AAV2.	74
Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten Vektordosen bei systemischer Applikation von AAV – Vektoren im Maus – Modell.	94
Tabelle 4.2: Zusammenstellung histopathologischer Untersuchungen bei männlichen Mdx – Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten.....	101

6.3. Abkürzungsverzeichnis

µDys	Mikrodystrophin
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
AON	antisense Oligonukleotide
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
CMV	Cytomegalovirus
DAG-Komplex	Dystrophin assoziierter Glykoproteinkomplex
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMD	Duchenne Muskeldystrophie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EKG	Elektrokardiogramm
FACS	fluorescence activated cell sorting
FS	<i>fraction of shortening</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HE	Hämatoxylin – Eosin
ITR	invertierte terminale Wiederholung
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kTNT	kardiales Troponin T
LB	Luria – Bertani
M	Molar
Mb	Megabasen
MB	Mikrosphären
Mdx	Muskeldystrophie vom Typ Duchenne X – chromosomal

MLC	Myosinleichtkette 2v
Mol	Mol
M.q.f.	<i>Musculus quadriceps femoris</i>
M.sol.	<i>Musculus soleus</i>
N ₂	Stickstoff
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamid – Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	potentium Hydrogenii
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
RLE	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
Sgc	Sarkoglykan
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-EDTA-Eisessig
TBE	Tris-Borat-EDTA
UpM	Umdrehungen pro Minute
US	Ultraschall
utrn	Utrophin
vG	virale Genome
v.G.	Elastika van Gieson

Die Gewichts- und Mengeneinheiten entsprechen den SI - Einheiten. Die Bezeichnung der Aminosäuren erfolgte nach der internationalen UPAC – Nomenklatur.